

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química-Física



**SÍNTESIS Y DESARROLLO DE NUEVOS
SISTEMAS POLIMÉRICOS CON CAPACIDAD
ANTIANGIOGÉNICA.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Luis García Fernández

Bajo la dirección de los doctores

Julio San Román del Barrio
María Rosa Aguilar de Armas

Madrid, 2011

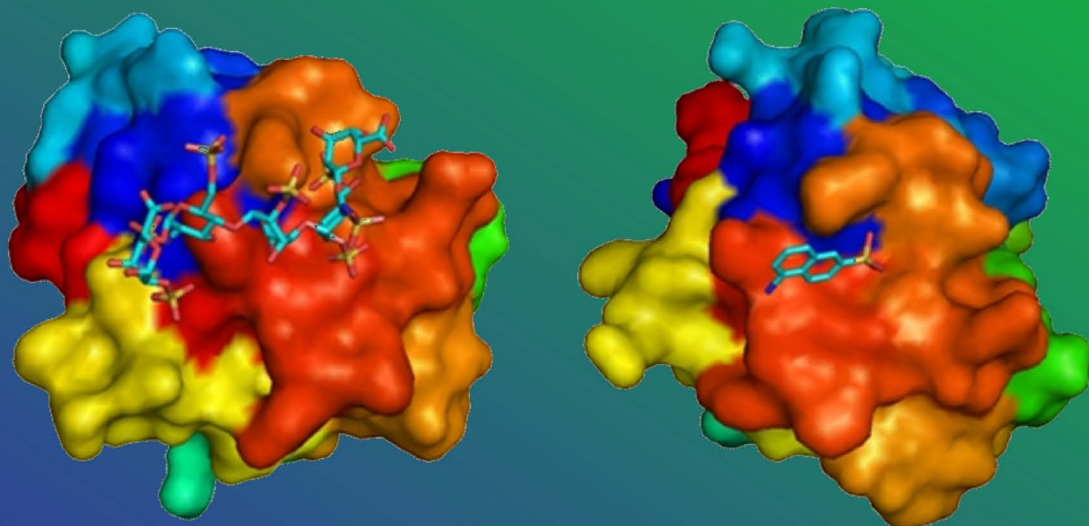
ISBN: 978-84-694-1424-8

© Luis García Fernández, 2010

LUIS GARCÍA FERNÁNDEZ

TESIS DOCTORAL

SÍNTESIS Y DESARROLLO DE NUEVOS SISTEMAS POLIMÉRICOS CON CAPACIDAD ANTIANGIOGÉNICA



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Departamento de Química-Física I

INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
Departamento de Biomateriales

Madrid 2010

TESIS DOCTORAL

**SÍNTESIS Y DESARROLLO DE NUEVOS
SISTEMAS POLIMÉRICOS CON
CAPACIDAD ANTIANGIOGÉNICA**

LUIS GARCÍA FÉRNANDEZ

DIRECTORES

Julio San Román del Barrio

María Rosa Aguilar de Armas



**CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA DE POLÍMEROS
Departamento de Biomateriales**



**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química-Física**

MADRID, 2010

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química-Física



**SÍNTESIS Y DESARROLLO DE NUEVOS
SISTEMAS POLIMÉRICOS CON
CAPACIDAD ANTIANGIOGÉNICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Luis García Fernández

BAJO LA DIRECCIÓN DE LOS DOCTORES

Julio San Román del Barrio

María Rosa Aguilar de Armas

MADRID, 2010

El presente trabajo de investigación, titulado: **“Síntesis y desarrollo de nuevos sistemas poliméricos con capacidad antiangiogénica”** ha sido realizado en el Departamento de Biomateriales del Instituto de Ciencia y Tecnología de Polímeros del CSIC, bajo la dirección de los doctores D. Julio San Román del Barrio y Dña. María Rosa Aguilar de Armas, para optar al grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Parecía que este momento no iba a llegar nunca, pero aquí estamos. Seguramente ésta es la única parte que muchos de vosotros leeréis de esta tesis, ¡qué le vamos a hacer! Os comprendo, son muchos los congresos, reuniones de grupo y charlas varias en las que he ido desmenuzando partes de esta tesis. Yo también estaría cansado de oír hablar de angiogénesis (creo que todos sabemos ya lo que es sin necesidad de ver ningún video de miedo).

En primer lugar me gustaría dar las gracias a los responsables del presente trabajo, Julio y Curra. Julio, gracias por darme la oportunidad de venir al Grupo de Biomateriales (que posteriormente se convirtió en Departamento) y permitirme crecer científicamente en el mundo de los polímeros. También gracias por esos caramelillos que nos endulzan las tardes. Curra, gracias por venir a sacarme del agujero negro que sufren todas las tesis en algún momento y por estar siempre disponible, incluso en tiempos de bodas, partos,... Gracias a los dos este trabajo ha llegado a buen puerto.

Gracias también a Blanca, que aunque no se haga notar mucho, siempre está ahí, aportando ideas interesantes y ayudándote en lo que haga falta.

Ya que estamos con “los jefes” me gustaría también agradecer a todos “los jefes” que tuve en mis estancias. Al Profesor Claudio Migliaresi del *Dipartimento di Ingegneria dei Materiali (Università degli Studi di Trento)* por descubrirme el electrospinning y permitirme asistir a los cursos de Ischia. Al Profesor C. James Kirkpatrick y al Doctor Sven Halstenberg del *Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz* por mostrarme un punto de vista celular que nunca había imaginado. Y también a la Doctora Cristina Abradelo del *Grupo de Interacciones Moleculares (Universidad CEU San Pablo)*, que primero vino ella y luego fui yo, para agobiarla con mis medidas de microcalorimetría.

También me gustaría agradecer a todas las personas que han pasado por el laboratorio y que también han hecho posible el desarrollo de esta tesis ya sea aportando alguna idea, saliendo a tomar una empanada a Lavapiés, una cerveza al hospital (al principio fue a Rosa) o simplemente discutiendo cualquier tontería que llegue a nuestros oídos. No quisiera dejarme a nadie, por lo que, empezando por el principio, está César, compañero de tardes musicales de bajo y trompeta en los sótanos de Lavapiés; a todos los que se fueron con él: Paloma, Elena, Verónica, Rodrigo y Alberto; y los que aguantan desde el principio: Luis Rojo, Luis Rodríguez, Mar (mi maestra en el mundo celular),

Gema, Gallardo y Pine; a los que llegaron conmigo y con los que he sufrido todo este tiempo: Diego y Marisa; a mis ex-compañeras el laboratorio de células, Sandra y Lorena que partieron a descubrir nuevos horizontes; a todos los que han ido llegando: Patricia, Paco, Feli, Álvaro, Belén y Fani; a todos los que pasaron algún tiempo en el laboratorio: Cesare, Eva Servoli, Joana, Rodrigo, Tiago y Raúl (que parecía que no se iba a ir nunca); y a todo aquel del que me haya olvidado y que haya pasado conmigo algún momento agradable.

Por último, y no por ello menos importante, agradecer a mi familia su apoyo durante este tiempo, en el que han aprendido desde lo que es un polímero a cómo viven las células; y a Beatriz que siempre ha estado a mi lado y creo que ha sido y será la única que se ha leído todos mis abstracts, posters, artículos, DEA y la tesis.

Gracias a todos.

Parte de los resultados obtenidos durante la realización de esta memoria han dado lugar a las siguientes publicaciones:

L. García-Fernández, S. Halstenberg, R.E. Unger, M.R. Aguilar, C.J. Kirkpatrick, J. San Román. Anti-Angiogenic Activity of Heparin-Like Polysulfonated Polymeric Drugs in 3D Human Cell Culture. (2010) *Biomaterials*, 31 (2010) 7863-7872.

L. García-Fernández, M. R. Aguilar, M. M. Fernández, R. M. Lozano, G. Giménez, S. Valverde and J. San Román. Structure, Morphology, and Bioactivity of Biocompatible Systems Derived from Functionalized Acrylic Polymers Based on 5-Amino-2-naphthalene Sulfonic Acid. (2010) *Biomacromolecules*, 11 (7), pp 1763–1772.

García-Fernández, L., Aguilar, M.R., Fernández, M.M., Lozano, R.M., Giménez, G., Román, J.S. Antimitogenic polymer drugs based on AMPS: Monomer distribution-bioactivity relationship of water-soluble macromolecules. (2010) *Biomacromolecules*, 11 (3), pp. 626-634.

L. Garcia , M. M. Fernández , R. M. Lozano , G. Giménez , S. Valverde , J. San Román. Polímeros acrílicos portadores de grupos naftalensulfónicos con actividad antiangiogénica. (2008) *Biomecánica*, 16 (1), pp. 27-30



"Quien no haya experimentado la irresistible atracción de la ciencia, no podrá comprender su tiranía." *Dr. Frankenstein.* Mary Shelley

ÍNDICE

ÍNDICE.....	I
Abreviaturas	VII
I. Introducción.....	1
I.1 Fármacos poliméricos	4
I.2 Angiogénesis	7
I.3 Angiogénesis tumoral y terapia antiangiogénica	11
I.4 Derivados poliméricos portadores de grupos sulfónicos. Actividad antiangiogénica	20
I.5 Bibliografía	25
II. Objetivos.....	31
III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos	35
III.1 Introducción	37
III.1.1 Descripción de los monómeros	38
III.2 Materiales y métodos.....	40
III.2.1 Reactivos	40
III.2.2 Síntesis del derivado metacrílico del ácido 5- aminonaftalen-2-sulfónico.....	41
III.2.3 Síntesis de los copolímeros	42
III.2.4 Caracterización general de los sistemas poliméricos	43
III.3 Resultados y discusión	45
III.3.1 Síntesis de monómeros y polímeros	45
III.3.2 Caracterización de los productos de reacción	46
III.3 Bibliografía	71
IV. Caracterización microestructural	77
IV.1 Introducción	79

IV.1.1	Copolimerización radical. Relaciones de reactividad. ...	81
IV.1.2	Dispersión de luz dinámica	88
IV.1.3	Potencial Zeta.....	89
IV.2	Materiales y métodos.....	93
IV.2.1	Reactivos.....	93
IV.2.2	Seguimiento de la copolimerización mediante ¹ H-RMN <i>in situ</i>	93
IV.2.3	Medidas de movilidad electroforética y tamaño de partícula.	95
IV.3	Resultados y discusión	97
IV.3.1	Cálculo de la relaciones de reactividad.....	97
IV.3.2	Medidas de potencial zeta y tamaño de partícula.	111
IV.4	Bibliografía	114
V.	Inhibición <i>in vitro</i> de la mitogénesis inducida por aFGF	119
V.1	Introducción.....	121
V.1.1	Actividad antiangiogénica del poli(AMPS).....	122
V.1.2	Actividad antiangiogénica del ANSA	124
V.1.3	Titulación calorimétrica isotérmica.....	125
V.2	Materiales y métodos.....	132
V.2.1	Ensayos de inhibición de la mitogénesis inducida por aFGF	132
V.2.2	Grado de citotoxicidad	133
V.2.3	Estudio de las interacciones polímero-FGF y heparina-FGF	134
V.3	Resultados y discusión	134
V.3.1	Ensayos biológicos	134

V.3.2	Estudio de las interacciones polímero-FGF y heparina-FGF	144
V.4	Bibliografía	146
VI.	Desarrollo de un modelo tridimensional de angiogénesis <i>in vitro</i>	149
VI.1	Introducción	151
VI.1.2	Características de las ECMs sintéticas.....	153
VI.1.3	Inmunohistoquímica	154
VI.2	Materiales y métodos	157
VI.2.1	Cultivos celulares	157
VI.2.2	Preparación de matrices tridimensionales de fibrina... 157	
VI.2.3	Visualización del proceso de angiogénesis <i>in vitro</i> mediante tinción fluorescente e inmunofluorescencia.....	159
VI.3	Resultados y discusión	162
VI.3.1	Formación de estructuras tridimensionales.....	162
VI.3.2	Inhibición de la proliferación celular debida a la presencia de bFGF y/o VEGF en ensayos tridimensionales.....	166
VI.3.3	Organización celular en las matrices 3D de fibrina.....	173
VI.4	Bibliografía	177
VII.	Estudio de inhibición de la angiogénesis en modelo animal. 181	
VII.1	Introducción	183
VII.2	Materiales y métodos	185
VII.3	Resultados y discusión.....	187
VII.3.1	Ensayos <i>in vivo</i> en los sistemas poli(AB-co-AMPS)	188
VII.3.2	Ensayos <i>in vivo</i> en los sistemas poli(VP-co-MANSA)....	190
VII.3.3	Ensayos <i>in vivo</i> en los sistemas poli(AB-co-MANSA) ..	191

VII.4 Bibliografía.....	193
VIII. Summary and conclusions	195

Abreviaturas

¹H-RMN: Resonancia magnética nuclear de protón.

¹³C-RMN: Resonancia magnética nuclear de carbono.

AB: Acrilato de butilo.

aFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos ácido.

AIBN: α,α' -Azoisobutironitrilo.

AMPS: Ácido 2-acrilamido-2-metil-1-propanosulfónico.

ANSA: Ácido 5-amino-2-naftalensulfónico.

ATR-FTIR: Espectroscopía de infrarrojo con transformada de Fourier por reflectancia total atenuada.

bFGF: Factor de crecimiento de fibroblastos básico.

BSA: Suero de albúmina bovina.

DMEM: Medio mínimo esencial para el cultivo celular.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

DSC: Calorimetría diferencial de barrido.

ECM: Matriz extracelular.

FBS: Suero fetal bovino.

FGF: Factor de crecimiento de fibroblastos.

GPC: Cromatografía de permeación en gel.

HUVEC: Células endoteliales de cordón umbilical humano.

HSPG: Proteoglicano de heparán sulfato.

IR: Espectroscopía de infrarrojo.

ITC: Titulación calorimétrica isoterma.

M199: Medio de cultivo específico para células endoteliales.

MANSA: Metacrilato del ácido 5-amino-2-naftalensulfónico.

M_n: Peso molecular promedio en número.

M_w: Peso molecular promedio en peso.

NTS: Ácido naftalentrissulfónico.

PBS: Tampón fosfato.

PDGF: Factor de crecimiento derivado de plaquetas.

Poli(AB-co-AMPS): Copolímeros de AB y AMPS.

Poli(AB-co-MANSA): Copolímeros de AB y MANSA.

Poli(VP-co-AMPS): Copolímeros de VP y AMPS.

Poli(VP-co-MANSA): Copolímeros de VP y MANSA.

TEMED: *N,N,N',N'*-tetrametilmetilendiamina.

T_g: Temperatura de transición vítrea.

TGA: Análisis termo-gravimétrico.

TMS: Tetrametilsilano

TRITC: Tetrametil rodamina isocianato.

UV: Espectroscopía ultravioleta.

VEGF: Factor de crecimiento del endotelio vascular.

VP: *N*-Vinilpirrolidona.

I. Introducción

La síntesis y polimerización de nuevos monómeros que contengan grupos funcionales activos es un campo en continuo desarrollo debido a la amplia gama de propiedades que pueden lograrse mediante homopolimerizaciones o copolimerizaciones con otras familias de monómeros. Además, la copolimerización ofrece amplias posibilidades de preparar sistemas biológicamente inertes, bioactivos y/o biodegradables mediante una adecuada selección de estructuras.

Durante la última década, el uso de sistemas poliméricos para la administración de fármacos y como soportes biomédicos, ha aumentado de forma considerable. Las aplicaciones biomédicas más importantes de los polímeros biodegradables son la liberación controlada de fármacos, implantes y estructuras para reparación de fracturas, aplicaciones dentales, lentes de contacto, regeneración de órganos e injertos vasculares¹.

El objetivo del presente trabajo ha sido la síntesis y caracterización de varias familias de polímeros que presentan grupos funcionales con capacidad para inhibir la angiogénesis, así como el estudio de su actividad biológica, biocompatibilidad y su aplicación en procesos tumorales.

De entre los numerosos tipos de monómeros posibles para la copolimerización se han elegido los derivados acrílicos (Figura I.1) debido a sus buenas propiedades y su amplia y variada aplicación como biomateriales. El comportamiento de este tipo de polímeros depende fundamentalmente del tipo de sustituyente en las cadenas laterales, lo

que permite la incorporación de diferentes grupos funcionales que modifican propiedades como la hidrofilia/hidrofobia, propiedades térmicas, mecánicas, etc. Algunos de los polímeros acrílicos más utilizados, entre otros, son: el poli(metacrilato de metilo), por sus buenas propiedades mecánicas en aplicaciones como cementos óseos²; e hidrogeles de poli(metacrilato de 2-hidroxietilo) como soportes biológicos³.

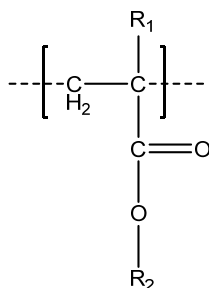


Figura I.1. Estructura química de los polímeros acrílicos ($\text{R}_1=\text{H}$) ó metacrílicos ($\text{R}_1=\text{CH}_3$).

La principal ventaja de este tipo de polímeros es la facilidad para preparar nuevos sistemas mediante reacciones de copolimerización radical, pudiendo diseñar copolímeros con diferentes propiedades de forma sencilla y eficaz.

I.1 Fármacos poliméricos

La finalidad principal de copolimerizar sustancias farmacológicamente activas es la obtención de sistemas que permitan una liberación controlada y localizada del compuesto activo. El diseño de los primeros dispositivos de liberación controlada de fármacos se centraba en el desarrollo de perfiles constantes o sostenidos de liberación (cinéticas

de orden cero) de cara a evitar los problemas asociados con la administración convencional múltiple y mantener una concentración efectiva constante (Figura I.2).

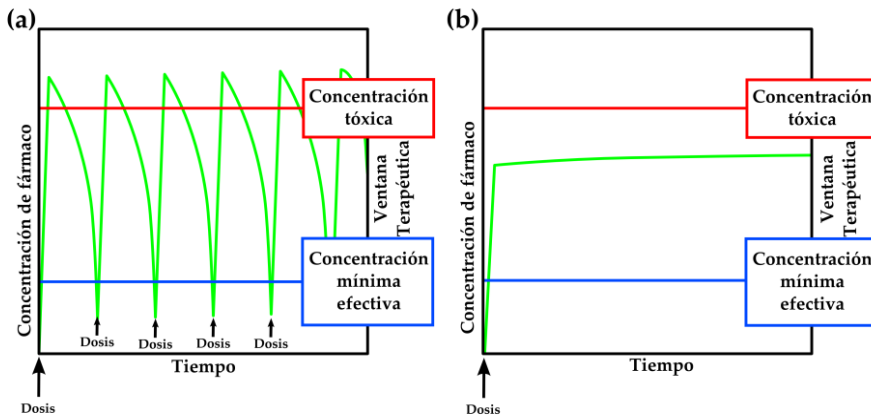


Figura I.2. Esquema de la dosificación tradicional de fármacos (a) frente a la dosificación por liberación controlada (b).

En los últimos años, el campo de los sistemas de liberación de medicamentos ha sufrido un gran desarrollo. Actualmente, su diseño incluye la vectorización hacia los tejidos, células o incluso compartimentos subcelulares apropiados, así como el ajuste de los perfiles al ritmo circadiano. Además, las investigaciones actuales en liberación de fármacos intentan cubrir otras necesidades específicas como¹:

- ✓ Conseguir una liberación sostenida y a velocidad controlada de medicamentos hidrosolubles.
- ✓ Mejorar la biodisponibilidad de medicamentos poco solubles en agua.
- ✓ Liberar dos o más agentes en una misma formulación.

- ✓ Desarrollar soportes fácilmente eliminables.
- ✓ Optimizar la biodistribución de medicamentos en el organismo.

Desde el punto de vista estructural, los sistemas poliméricos con actividad farmacológica pueden presentar una estructura química muy variada, aunque pueden clasificarse genéricamente en dos tipos: el primero está basado en la unión física de compuestos farmacológicamente activos a matrices poliméricas. La liberación del fármaco se produce por simple difusión a través de una matriz hinchada o una membrana semipermeable. El segundo tipo de sistemas, con actividad farmacológica, consiste en cadenas poliméricas de peso molecular controlado que incorporan el principio activo en la propia macromolécula o unido covalentemente a ella. En estos casos, los enlaces que unen el fármaco al esqueleto macromolecular deben ser hidrolíticamente sensibles a pH fisiológico. Pueden ser sintetizados por dos vías diferentes: bien mediante reacciones de polimerización o bien mediante reacciones de modificación de grupos laterales. El modelo que describe la unión entre fármaco y polímero fue propuesto por Ringsdorf⁴ y supone que el sistema está formado por tres componentes: un componente que proporcione hidrofilia o hidrofobia según el lugar de aplicación del medicamento, un segundo componente para el anclaje del compuesto activo y, por último, puede añadirse un tercer componente para aplicaciones específicas como la vectorización de la molécula bioactiva.

Sin embargo, el comportamiento biológico de estos sistemas va a depender tanto de los monómeros que constituyen el esqueleto ma-

cromolecular, como de las características microestructurales de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización⁵⁻⁶. Por ello, se estudiarán las relaciones de reactividad, que son dos de los parámetros cinéticos más característicos que definen a un sistema copolimérico que se ajusta al modelo terminal⁷. Estos parámetros proporcionan información acerca de la composición media y la distribución estadística de secuencias de monómeros en el sistema copolimérico⁸. Estos parámetros se pueden determinar mediante la monitorización *in situ* por resonancia magnética nuclear de protón (¹H-RMN) de la reacción de copolimerización y el ajuste no lineal de los datos de composición a la forma integrada de la ecuación de copolimerización⁷. De esta forma, se obtienen datos de relaciones de reactividad sin manipulación de la muestra ni aislamiento del copolímero.

I.2 Angiogénesis

El término angiogénesis (del griego *ἀγγείου*, vaso y *γένεσις*, proceso de formación) se define literalmente como el proceso fisiológico de formación de vasos sanguíneos. Esta definición comprende realmente dos procesos totalmente distintitos de formación de vasos sanguíneos y que conviene diferenciar:

- ✓ Vasculogénesis (Figura I.3): Las células endoteliales surgen de células poco especializadas denominadas angio-blastos, los cuales se alinean formando el interior de los

vasos sanguíneos. Este proceso es crucial en la formación de ramificaciones que unirán unos vasos con otros.

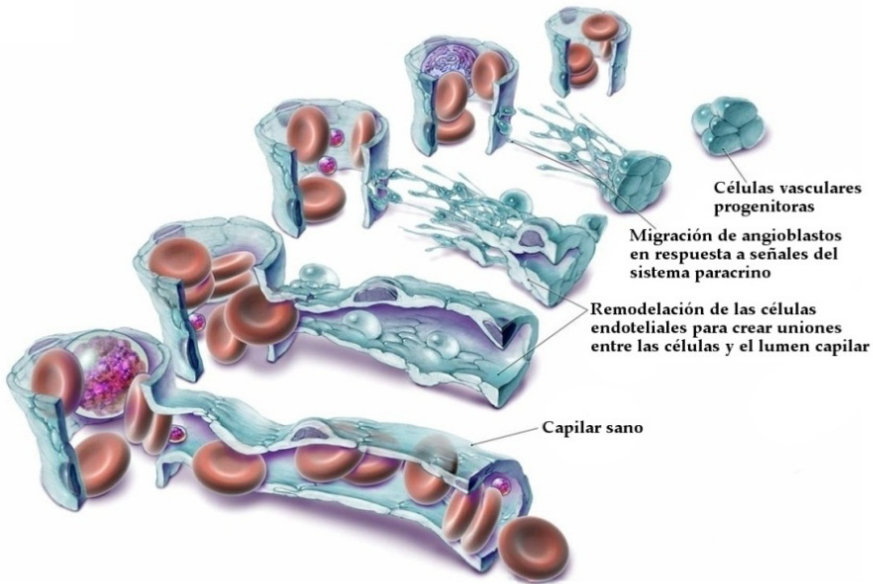


Figura I.3. Proceso de formación de vasos sanguíneos a partir de células poco especializadas o vasculogénesis⁹.

- ✓ **Angiogénesis (Figura I.4):** Es la formación de vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes. Es un proceso complejo en el que las células endoteliales se activan mediante una señal angiogénica, sintetizando y liberando enzimas degradativas. Esto permite la remodelación de la matriz extracelular facilitando la migración, proliferación y diferenciación de las células endoteliales para dar lugar a los capilares.

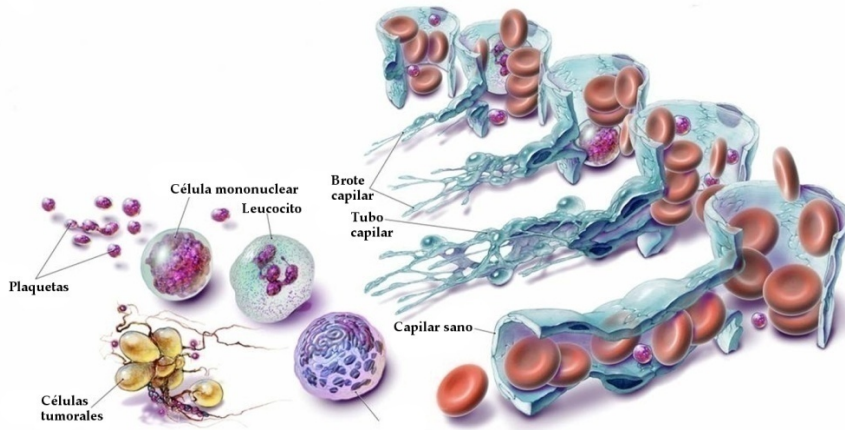


Figura I.4. Proceso de formación de vasos sanguíneos a partir de otros ya existentes o angiogénesis⁹.

La formación de vasos sanguíneos es un proceso vital para la supervivencia de los tejidos, ya que garantiza el suministro de nutrientes y la eliminación de residuos de las células. La angiogénesis se encuentra estrechamente relacionada con numerosos procesos biológicos, como son: el desarrollo embrionario y post-embrionario, el ciclo reproductivo o procesos de cicatrización. En ocasiones, es conveniente estimular dicho proceso en enfermedades que afectan a los vasos sanguíneos, como ocurre en caso de isquemia^{a,10-11}. Por otro lado, alteraciones en el proceso de angiogénesis están relacionadas con numerosas enfermedades como son: psoriasis¹², artritis reumatoide¹³, crecimiento tumoral¹⁴, retinopatía diabética¹⁵... Por lo tanto, la modulación de la angiogénesis es un proceso fundamental en el tratamiento de numerosas patologías y enfermedades.

^a Sufrimiento celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico.

El proceso de angiogénesis está regulado por el balance existente entre señales proangiogénicas y antiangiogénicas. Este balance se encuentra fuertemente influenciado por las funciones biológicas de proteoglicanos tipo heparán sulfato (HSPGs) y su capacidad de unión a numerosos factores de crecimiento implicados en el proceso de angiogénesis¹⁶. Los HSPGs son glicosaminoglicanos sulfonados del tipo de la heparina y del heparán sulfato cuya actividad se basa en tres diferentes mecanismos de acción¹⁷:

- ✓ Incrementan la concentración local de ciertos factores proangiogénicos en las proximidades de los receptores celulares.
- ✓ Inducen un cambio conformacional en dichos factores proangiogénicos facilitando su interacción con los receptores de la membrana celular.
- ✓ Inducen la oligomerización de los factores proangiogénicos permitiendo la dimerización y activación del receptor.

Los receptores de la membrana celular son moléculas de alta afinidad con actividad tirosina-kinasa. La unión de estos con algunos factores proangiogénicos dimeriza el receptor estimulando su actividad tirosina-kinasa, que consiste en la transferencia de los grupos fosfato γ de la molécula de ATP a grupos hidroxilo de las tirosinas que están presentes en los receptores. De esta manera se activa una cascada intracelular de señales que conduce a la proliferación celular (Figura I.5)¹⁸.

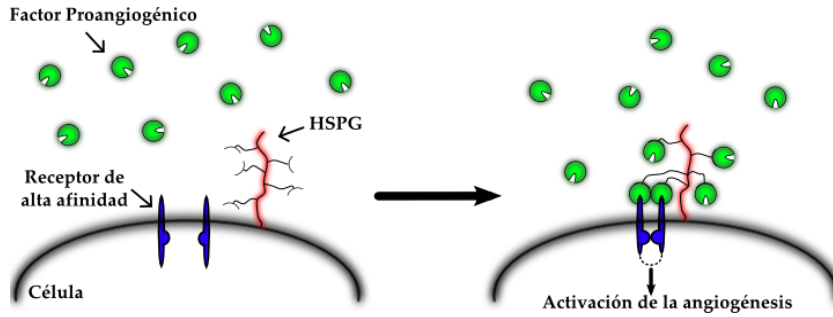


Figura I.5. Activación de los receptores tirosina-kinasa con mediación de los HSPG.

I.3 Angiogénesis tumoral y terapia antian- giogénica

Tal y como se mencionó en el apartado anterior, una sobrerregulación de las señales proangiogénicas está relacionado con numerosas enfermedades. Una de las más importantes es la angiogénesis tumoral, que interviene en el desarrollo de tumores sólidos. Investigadores de la Universidad de Viena han establecido una correlación importante entre la densidad de vasos sanguíneos que irrigan el tumor y el tamaño del tumor, capacidad metastática, tipo histológico y grado de malignidad de dicho tumor¹⁹.

Los trabajos de investigación llevados a cabo por Folkman y colaboradores²⁰⁻²² llegaron a la conclusión de que en el crecimiento tumoral se pueden distinguir dos fases:

- ✓ Fase prevascular: Cuando el tumor aún no ha alcanzado un tamaño crítico aproximado de 2 mm³ se desarrolla sin neovascularización, obteniendo sus nutrientes por difu-

sión de los tejidos circundantes y manteniéndose en un estado de latencia.

- ✓ Fase angiogénica: Cuando el tumor supera el tamaño crítico necesita un mayor aporte de nutrientes y oxígeno, por lo que es necesaria su vascularización. En este estado, el tumor segrega factores proangiogénicos que provocan la vascularización del mismo. Este proceso de vascularización se da de forma descontrolada y los nuevos vasos sanguíneos que se forman están atrofiados y son permeables (Figura I.6).



Figura I.6. El proceso descontrolado de angiogénesis tumoral provoca la formación de capilares atrofiados y permeables⁹.

Esta fisiología tumoral permite el intercambio de macromoléculas e incluso de células del torrente sanguíneo y viceversa. Esto permite el suministro de nutrientes al tumor y que las células puedan pasar al torrente sanguíneo; con el consiguiente riesgo de metástasis tumoral²¹.

Existen numerosas proteínas con capacidad proangiogénica²³ (Tabla I.1), siendo las más comúnmente identificadas en los tumores el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) (Figura I. 7) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF)²⁴.

Factor de crecimiento de fibroblastos:
- Básico (bFGF)
- Ácido (aFGF)
Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF)
Factor de transformación α (TGF α)
Factor estimulador de colonias de granulocitos (G-CSF)
Factor de crecimiento placentario (PGF)
Interleukina 8(IL-8)
Factor de crecimiento de hepatocitos (HGF)
Proliferina
Factor de crecimiento plaquetario (PDGF)
Factor de transformación β (TGF β)
Factor de necrosis tumoral (TNF)
Angiogeninas

Tabla I.1 Reguladores endógenos positivos de la proliferación de las células endoteliales.

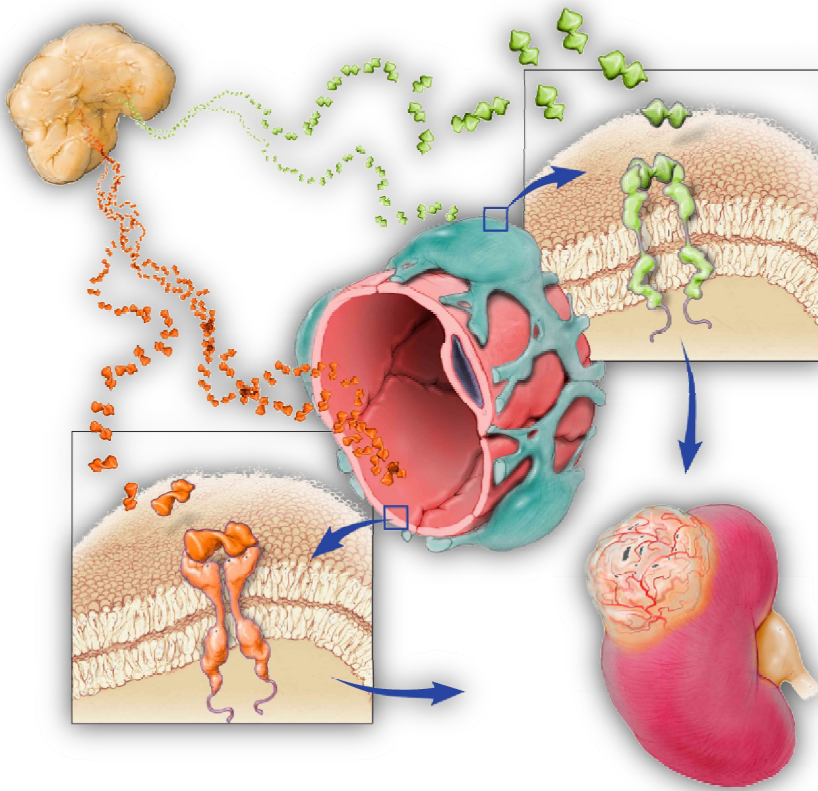


Figura I. 7. Los tumores segregan distintos factores proangiogénicos que interaccionan con los receptores de la membrana celular activando la formación de nuevos vasos sanguíneos que vascularizan el tumor suministrándole nutrientes⁹.

Factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF): Es el factor proangiogénico más importante. Se detecta en tumores de origen epitelial y está asociado con otros estados clínicos como isquemia de miocardio y enfermedades de la retina (retinopatía diabética, edema macular, oclusiones venosas,...) En los tejidos neoplásicos su síntesis es promovida por las propias células tumorales.

Factor de crecimiento de fibroblastos (FGF): Es una familia de proteínas que está muy involucrada en procesos de angiogénesis, recuperación de tejidos y en el desarrollo embrionario. Las isoformas más relevantes en el desarrollo de tumores son: el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (aFGF) y el básico (bFGF). Ambos pueden incrementar la proliferación de las células endoteliales favoreciendo la vascularización del tumor. En general el aFGF es menos estable que el bFGF y ambos necesitan de la presencia de HSPGs para presentar actividad biológica.

El papel que juega la angiogénesis en el crecimiento de tumores sólidos ha sido estudiado en profundidad. Folkman y colaboradores²² demostraron el efecto de la angiogénesis introduciendo fragmentos de tumor en la cornea de un conejo (zona avascular). Los implantes atrajeron nuevos capilares que crecieron vascularizando la masa del tumor. Posteriormente se inhibió la angiogénesis deteniéndose así el crecimiento del tumor. Estudios posteriores²⁵⁻²⁶ revelaron que la ausencia de una vascularización adecuada provoca que las células tumorales se vuelvan necróticas y/o apoptóticas, frenando el aumento de volumen del tumor.

De esta forma se puede definir la terapia antiangiogénica como el tratamiento basado en la inhibición de la angiogénesis tumoral con el fin de impedir la vascularización del tumor que aporte nutrientes y un medio para su metástasis evitando el crecimiento y desarrollo de éste.

Este tipo de terapias presenta una serie de ventajas comparada con las terapias tradicionales (quimioterapia, radioterapia...) entre las que se pueden destacar las siguientes²⁷:

- ✓ La terapia antiangiogénica está dirigida principalmente a las células endoteliales, que son homogéneas y genéticamente estables (raramente ocurren mutaciones espontáneas en ellas). Esto contrasta con la alta inestabilidad y heterogeneidad de las células tumorales; lo que favorece la selección de subpoblaciones resistentes a la quimioterapia.
- ✓ Los vasos sanguíneos activados poseen marcadores específicos, y los factores proangiogénicos receptores, que se podrían utilizar para el desarrollo de fármacos que fuesen dirigidos a esas células.
- ✓ El hecho de que una sola red vascular soporte el crecimiento de diversas poblaciones de células tumorales permite que la inhibición de un pequeño número de vasos sanguíneos afecte a un gran número de células tumorales.

Dentro de la denominada terapia antiangiogénica existen diferentes estrategias para inhibir dicho proceso, la cuales quedan resumidas en la Figura I.8:

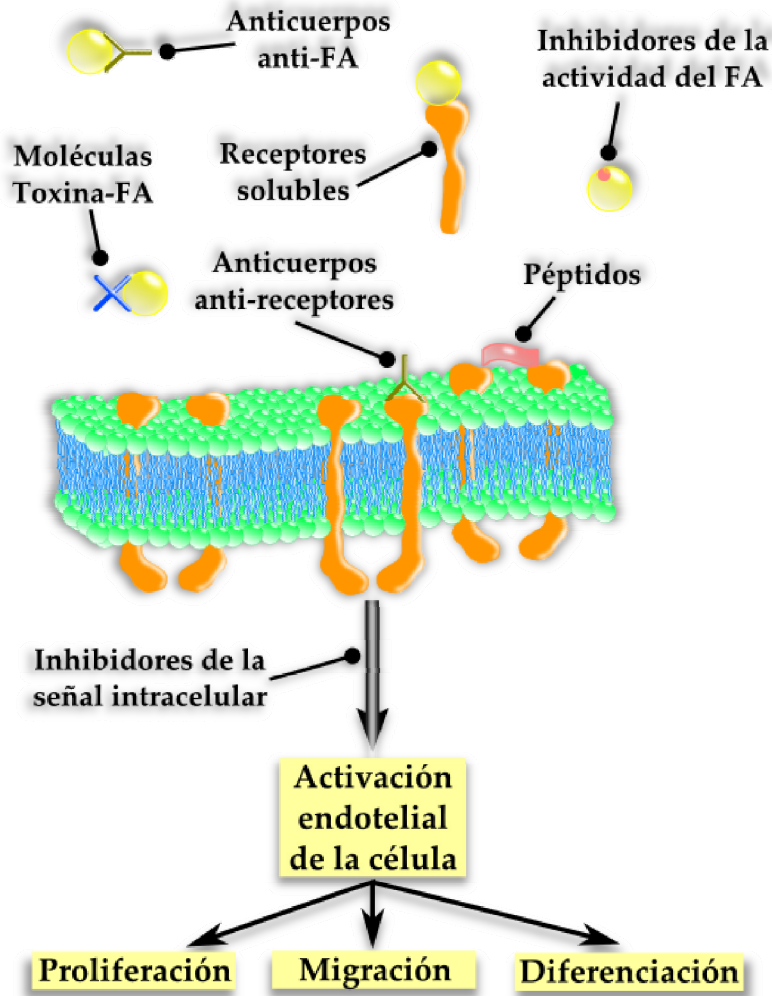


Figura I.8. Estrategias posibles para la inhibición del proceso de angiogénesis (FA: Factor proangiogénico).

- a) Inhibidores de los factores proangiogénicos:** Son de tipo competitivo y bloquean la unión del factor proangiogénico al receptor, deteniendo así la secuencia de señales que activan la angiogénesis.
- i. - Anticuerpos o toxinas anti-factor proangiogénico:* Los anticuerpos se unen selectivamente a los factores proangiogénicos inhibiendo

así la unión de estos a sus receptores situados en la superficie de las células endoteliales²⁸. Un ejemplo de este tipo de sustancias es el anticuerpo *rhu Anti-VEGF Mab*, comercializado por *F. Hoffmann-La Roche Ltd* con el nombre de Avastin®. Éste medicamento se emplea en el tratamiento del cáncer colorectal, degeneración macular, cáncer de pulmón no microcítico o carcinoma de células renales; y su actividad es debida a que la unión del anticuerpo con el VEGF, inhibiendo así la unión de los receptores Flt-1 y KDR²⁹.

ii. - *Receptores solubles*: Son moléculas similares a los receptores de la membrana celular que se encuentran disueltos en el medio y secuestran los factores proangiogénicos. Se ha visto que incluso en organismos sanos existe una cantidad variable de receptores solubles que ayudan a mantener el equilibrio en la actividad de los factores proangiogénicos³⁰, inhibiéndose ésta cuando se suministran de forma intravenosa³¹. A partir de esta estrategia se han sintetizado fármacos como Aflibercept® , desarrollado conjuntamente por *Sanofi-Aventis Groupe* y *Regeneron Pharmaceuticals, Inc.* Aflibercept® es un derivado de distintos VEGFRs unidos a segmentos de inmunoglobulina y que ha demostrado poseer una potente capacidad antiangiogénica³², con resultados prometedores en el tratamiento del cáncer ovario y cáncer de pulmón avanzado.

iii. - *Inhibidores de la actividad de los factores proangiogénicos*: La actividad de algunos factores proangiogénicos depende de la concen-

tracción extracelular de moléculas del tipo HSPGs; por lo tanto, la administración de sustancias análogas a los HSPGs constituye otra ruta para la inhibición de dichos factores. Entre otros, las suraminas, naftilureas polisulfonadas, han demostrado la capacidad de unirse a diversos factores proangiogénicos, como el PDGF y el bFGF, impidiendo su unión con los HSPGs e inhibiendo por tanto la angiogénesis³³⁻³⁵.

b) Inhibidores de los receptores de los factores proangiogénicos: Los niveles de factores proangiogénicos suelen ser muy variables en el espacio y en el tiempo, por lo que su neutralización puede llegar a ser complicada. Además el número de receptores en las células es relativamente menor, y, al menos en teoría, son más fácilmente saturables con menor concentración de antagonista.

i. - Anticuerpos anti-receptores: Al igual que en el caso de los factores proangiogénicos, el uso de anticuerpos es una vía prometedora para la inhibición de la angiogénesis. Actualmente se están desarrollando anticuerpos como el Ramucirumab®, de ImClone Systems Inc, que actúa contra los receptores del VEGF y que está mostrando una buena capacidad de inhibición de la angiogénesis. Este fármaco aun se encuentra en la fase de estudio clínico³⁶⁻³⁷.

ii. - Péptidos: Se encuentran en un estado menos avanzado y suelen ser moléculas con secuencias de unión al receptor del factor angiogénico que impiden la unión del propio factor³⁸.

- c) **Inhibidores de la señal intracelular:** Consiste en la inhibición de la fosforilación del receptor del factor proangiogénico, lo que produce un bloqueo en la transducción de la señal generada por los factores proangiogénicos. Existen numerosos fármacos en diferentes fases de estudio que utilizan esta vía de inhibición, algunos ejemplos son: *Zactima*[®] (Astra Zeneca Pharmaceuticals LP) en fase clínica I³⁹ o *Nexavar*[®] (Bayer Pharmaceuticals Corp.) en fase clínica III⁴⁰. Sus propiedades residen en la inhibición de la actividad de tirosina-kinasa.
- d) **Otros inhibidores de la angiogénesis:** Podemos encontrar algunas sustancias que inhiben la angiogénesis pero que no se ha podido elucidar el mecanismo por el cual actúan. Un ejemplo es el AGM1470 (TAP Pharmaceuticals), que es un producto de la degradación del *Aspergillus fumigillus*. El AGM1470 inhibe fuertemente la proliferación celular y la formación de nuevos vasos sanguíneos, y por tanto suprime el crecimiento del tumor⁴¹.

I.4 Derivados poliméricos portadores de grupos sulfónicos. Actividad antiangiogénica

Muchos de los factores pro-angiogénicos son muy afines a glicosaminoglicanos sulfonados del tipo de la heparina y del heparán sulfato, y su unión a estos compuestos hacen que sean biológicamente activos, por lo que cualquier proceso que impida dicha interacción constituye un claro objetivo para conseguir la inhibición de la angiogénesis. El diseño de sistemas poliméricos estructuralmente similares a los proteo-

glicanos puede ser una vía importante en la lucha contra tumores sólidos mediante la inhibición de la angiogénesis producida por éstos. Dentro de este campo se han estudiado moléculas como las suraminas, binaftil ureas polisulfonadas (Figura I.9), que han sido empleadas en el tratamiento de tumores que no respondían a la quimioterapia convencional. Esta actividad farmacológica está basada, al menos en parte, en la capacidad de la suramina de impedir que diversos factores de crecimiento, como son el PDGF y el bFGF, sean reconocidos por los receptores correspondientes de la membrana celular^{33-34, 42} y también en su interacción con los receptores de los VEGF⁴³. Pero el uso clínico de las suraminas está fuertemente limitado debido al amplio rango de efectos tóxicos que presentan, donde la neurotoxicidad es una de las más importantes⁴⁴⁻⁴⁵. El alto grado de toxicidad de las suraminas limita su uso como fármacos antiangiogénicos, por lo que se buscaron otros derivados de éstas que presentasen un menor grado de citotoxicidad manteniendo sus propiedades antiangiogénicas. Así, se desarrolló una clase de compuestos no citotóxicos con actividad antiangiogénica y antitumoral denominados suradistas (Figura I.9) que son derivados binaftilsulfonato de la distamicina.

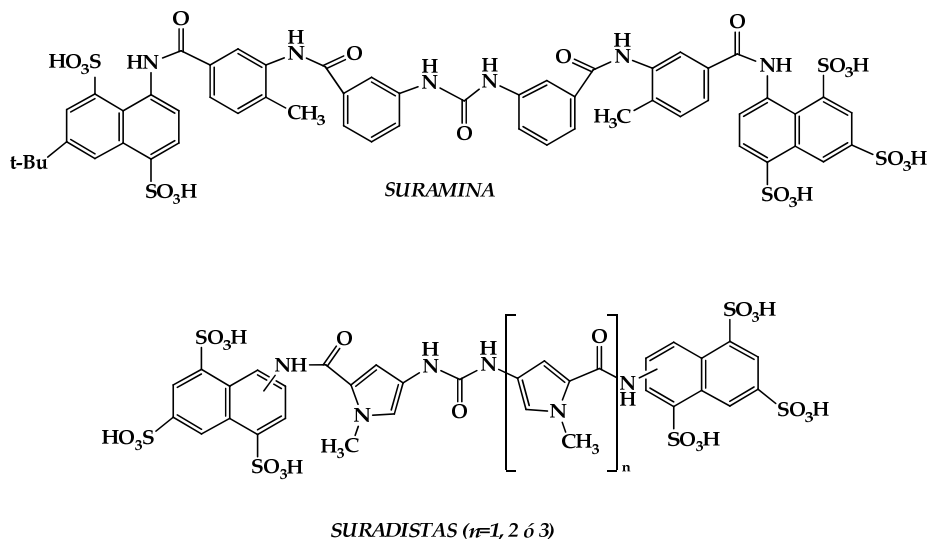


Figura I.9. Estructura de las suraminas y suradistas.

Estos compuestos interaccionan fuertemente con los FGF, inhibiendo su unión a los receptores de la membrana celular y suprimiendo su actividad proangiogénica⁴⁶⁻⁴⁸.

De acuerdo con la estructura molecular de las suraminas y suradistas, se estudió el ácido 1,3,6-naftalentrissulfónico (NTS) como la estructura que posee las propiedades antiangiogénicas, obteniendo resultados positivos *in vivo* e *in vitro* en la inhibición de la angiogénesis inducida por FGF. A partir de estos resultados, Lozano y colaboradores⁴⁹ estudiaron una serie de derivados del NTS con menor número de grupos sulfónicos (Figura I.10).

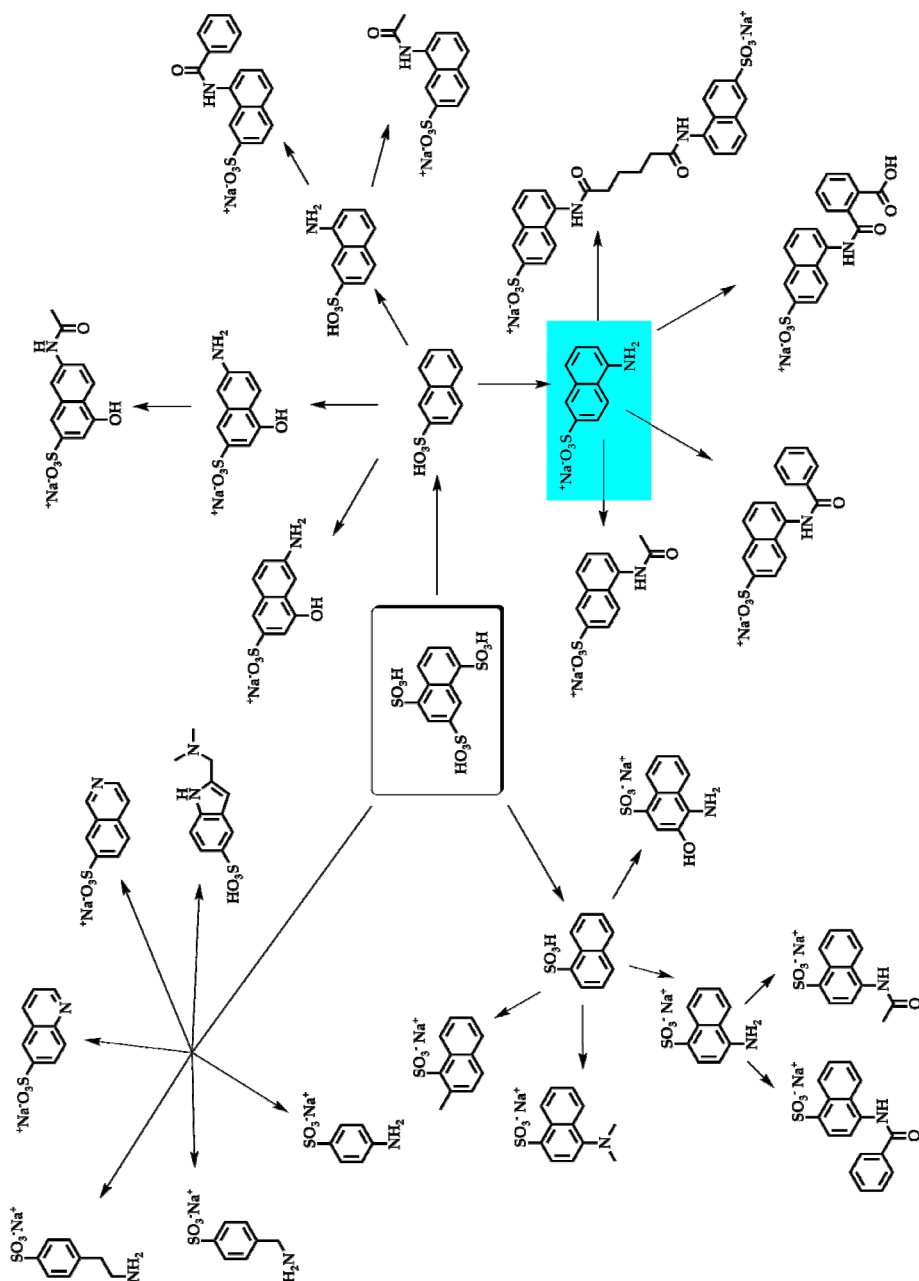


Figura I.10. Derivados del NTS estudiados por Lozano y colaboradores⁴⁹ como inhibidores de la angiogénesis. En azul el ANSA.

Los resultados obtenidos indicaron que estos derivados presentan mayor actividad, sin embargo, llevan asociada una alta toxicidad. De todos los compuestos estudiados los mejores resultados se obtuvieron con el ácido 5-amino-2-naftalensulfónico (ANSA). Por esta razón, se ha elegido esta molécula para el desarrollo de nuevos fármacos poliméricos con capacidad antiangiogénica.

El uso de compuestos como suraminas y suradistas como inhibidores de la angiogénesis tiene una limitación importante debido al estrecho margen que existe entre la dosis mínima para inhibir la angiogénesis y la dosis en la que aparecen efectos tóxicos (ventana terapéutica).

En la búsqueda de nuevos polianiones sulfónicos con menor toxicidad que estos compuestos se ha descubierto que los derivados sulfónicos de la distamicina A se unen a factores de crecimiento de fibroblastos inhibiendo la angiogénesis. Varios investigadores se han centrado en el estudio de la actividad de polímeros sulfónicos como el poli(ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico) (AMPS), poli(ácido 4-estirensulfónico) (PSS) o poli(ácido vinilsulfónico) (PVS) y han resultado ser potentes inhibidores de la angiogénesis sin llegar a presentar los efectos tóxicos de las suraminas y suradistas^{5, 50}.

Partiendo de estas ideas se pueden desarrollar nuevas familias de copolímeros polisulfonados similares estructuralmente a los HSPGs que presenten capacidad para inhibir el proceso angiogénico.

I.5 Bibliografía

- (1) Dumitriu, S. *Polymeric biomaterials*, Second ed., Marcel Dekker, New York. 2002
- (2) Shinzato, S.; Kobayashi, M.; Mousa, W. F.; Kamimura, M.; Neo, M.; Kitamura, Y.; Kokubo, T., and Nakamura, T. Bioactive polymethyl methacrylate-based bone cement: Comparison of glass beads, apatite- and wollastonite-containing glass-ceramic, and hydroxyapatite fillers on mechanical and biological properties. *Journal of Biomedical Materials Research*. **2000**, 51 (2), 258-272.
- (3) Serrano Aroca, A.; Gómez Ribelles, J. L.; Monleón Pradas, M.; Vidaurre Garayo, A., and Suay Antón, J. Characterisation of macroporous poly(methyl methacrylate) coated with plasma-polymerised poly(2-hydroxyethyl acrylate). *European Polymer Journal*. **2007**, 43 (10), 4552-4564.
- (4) Ringsdorf, H. Structure and properties of pharmacologically active polymers. *J Polym Sci Polym Symp*. **1975**, (51), 135-153.
- (5) Liekens, S.; Leali, D.; Neyts, J.; Esnouf, R.; Rusnati, M.; Dell'era, P.; Maudgal, P. C.; De Clercq, E., and Presta, M. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds. *Molecular Pharmacology*. **1999**, 56 (1), 204-213.
- (6) Van Krevelen, D. W. *Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; Their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions*, Elsevier, Ed. 4, illustrated ed. 2009
- (7) Aguilar, M. R.; Gallardo, A.; Fernández, M. M., and San Román, J. In situ quantitative ¹H NMR monitoring of monomer consumption: a simple and fast way of estimating reactivity ratios. *Macromolecules*. **2002**, 35 2036-2041.
- (8) Fukuda, T.; Kubo, K., and Ma, Y. D. Kinetics of free radical copolymerization. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. **1992**, 17 (5), 875-916.

- (9) Swift, A. (2008) Angiogenesis vs. Vasculogenesis, In *Adobe Photoshop CS3 Macintosh* (angio_vs_vasculo_JBC-20copy.jpg, Ed.).
- (10) Al Mheid, I., and Quyyumi, A. A. Cell therapy in peripheral arterial disease. *Angiology*. **2009**, 59 (6), 705-716.
- (11) Haro, J. Meta-analysis of randomized, controlled clinical trials in angiogenesis: gene and cell therapy in peripheral arterial disease. *Heart and Vessels*. **2009**, 24 (5), 321.
- (12) Arbisser, J. L. Angiogenesis and the skin: A primer. *Journal of the American Academy of Dermatology*. **1996**, 34 (3), 486-497.
- (13) Paleolog, E. M., and Fava, R. A. Angiogenesis in rheumatoid arthritis: Implications for future therapeutic strategies. *Springer Seminars in Immunopathology*. **1998**, 20 (1-2), 73-94.
- (14) Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. **1990**, 82 (1), 4-6.
- (15) Xu, J. H.; Li, R. X.; Zhang, W., and Qi, F. Research progress of the mechanism on intraocular neovascularization. *International Journal of Ophthalmology*. **2008**, 8 (12), 2496-2498.
- (16) Johnson, D. E., and Williams, L. T. Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Advances in Cancer Research*. **1993**, 60 1-41.
- (17) Iozzo, R. V.; Zoeller, J. J., and Nyström, A. Basement membrane proteoglycans: Modulators Par Excellence of cancer growth and angiogenesis. *Molecules and Cells*. **2009**, 27 (5), 503-513.
- (18) Kim-Safran, C.; Farach-Carson, M. C., and Carson, D. D. Multifunctionality of extracellular and cell surface heparan sulfate proteoglycans. *Cellular and Molecular Life Sciences*. **2009**, 66 (21), 3421-3434.
- (19) Obermair, A.; Wanner, C.; Bilgi, S.; Speiser, P.; Kaider, A.; Reinthaller, A.; Leodolter, S., and Gitsch, G. Tumor angiogenesis in stage IB cervical cancer: Correlation of microvessel density with survival. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. **1998**, 178 (2), 314-319.
- (20) Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*. **1995**, 1 (1), 27-31.

- (21) Geiger, T. R., and Peeper, D. S. Metastasis mechanisms. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*. **2009**, 1796 (2), 293-308.
- (22) Gimbrone Jr, M. A.; Leapman, S. B.; Cotran, R. S., and Folkman, J. Tumor dormancy in vivo by prevention of neovascularization. *Journal of Experimental Medicine*. **1972**, 136 (2), 261-276.
- (23) Zetter, B. R. (1998) Angiogenesis and tumor metastasis, In *Annual Review of Medicine*, pp 407-424.
- (24) Campbell, S. C. Combining nebulised ipratropium and albuterol improved FEV1 but did not improve symptoms or quality of life in COPD. *Evidence-Based Medicine*. **1998**, 3 (4), 120.
- (25) Holmgren, L.; O'Reilly, M. S., and Folkman, J. Dormancy of micrometastases: Balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nature Medicine*. **1995**, 1 (2), 149-153.
- (26) Parangi, S.; O'Reilly, M.; Christofori, G.; Holmgren, L.; Grosfeld, J.; Folkman, J., and Hanahan, D. Antiangiogenic therapy of transgenic mice impairs de novo tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **1996**, 93 (5), 2002-2007.
- (27) Quesada, A. R.; Oz, C., and Medina, M. A. Anti-angiogenic drugs: From bench to clinical trials. *Medicinal Research Reviews*. **2006**, 26 (4), 483-530.
- (28) Asano, M.; Yukita, A.; Matsumoto, T.; Kondo, S., and Suzuki, H. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor. *Cancer research*. **1995**, 55 (22), 5296-5301.
- (29) Ignoffo, R. J. Overview of bevacizumab: a new cancer therapeutic strategy targeting vascular endothelial growth factor. *American journal of health-system pharmacy : AJHP : official journal of the American Society of Health-System Pharmacists*. **2004**, 61 (21 Suppl 5).
- (30) Barleon, B.; Reusch, P.; Totzke, F.; Herzog, C.; Keck, C.; Martiny-Baron, G., and Marmé, D. Soluble VEGFR-1 secreted by endothelial cells and monocytes is present in human serum and plasma from healthy donors. *Angiogenesis*. **2001**, 4 (2), 143-154.

- (31) Lin, P.; Polverini, P.; Dewhirst, M.; Shan, S.; Rao, P. S., and Peters, K. Inhibition of tumor angiogenesis using a soluble receptor establishes a role for Tie2 in pathologic vascular growth. *Journal of Clinical Investigation*. **1997**, 100 (8), 2072-2078.
- (32) Holash, J.; Davis, S.; Papadopoulos, N.; Croll, S. D.; Ho, L.; Russell, M.; Boland, P.; Leidich, R.; Hylton, D.; Burova, E.; Ioffe, E.; Huang, T.; Radziejewski, C.; Bailey, K.; Fandl, J. P.; Daly, T.; Wiegand, S. J.; Yancopoulos, G. D., and Rudge, J. S. VEGF-Trap: A VEGF blocker with potent antitumor effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **2002**, 99 (17), 11393-11398.
- (33) Danesi, R.; Del Bianchi, S.; Soldani, P.; Campagni, A.; La Roccas, R. V.; Myers, C. E.; Paparelli, A., and Del Tacca, M. Suramin inhibits bFGF-induced endothelial cell proliferation and angiogenesis in the chick chorioallantoic membrane. *British Journal of Cancer*. **1993**, 68 (5), 932-938.
- (34) Hosang, M. Suramin binds to platelet-derived growth factor and inhibits its biological activity. *Journal of Cellular Biochemistry*. **1985**, 29 (3), 265-273.
- (35) Middaugh, C. R.; Mach, H.; Burke, C. J.; Volkin, D. B.; Dabora, J. M.; Tsai, P. K.; Bruner, M. W.; Ryan, J. A., and Marfia, K. E. Nature of the interaction of growth factors with suramin. *Biochemistry*. **1992**, 31 (37), 9016-9024.
- (36) Lu, D.; Shen, J.; Vil, M. D.; Zhang, H.; Jimenez, X.; Bohlen, P.; Witte, L., and Zhut, Z. Tailoring in vitro selection for a picomolar affinity human antibody directed against vascular endothelial growth factor receptor 2 for enhanced neutralizing activity. *Journal of Biological Chemistry*. **2003**, 278 (44), 43496-43507.
- (37) Zhu, Z.; Bohlen, P., and Witte, L. Clinical development of angiogenesis inhibitors to vascular endothelial growth factor and its receptors as cancer therapeutics. *Current Cancer Drug Targets*. **2002**, 2 (2), 135-156.
- (38) Fairbrother, W. J.; Christinger, H. W.; Cochran, A. G.; Fuh, G.; Keenan, C. J.; Quan, C.; Shriver, S. K.; Tom, J. Y. K.; Wells, J. A., and Cunningham, B. C. Novel peptides selected to bind vascular

- endothelial growth factor target the receptor-binding site. *Biochemistry*. **1998**, 37 (51), 17754-17764.
- (39) Minami, H.; Ebi, H., and Tahara, M. A phase I study of an oral VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor ZD6474, in Japanese patients with solid tumors. *Proc Am Soc Clin Oncol*. **2003**, 22 194.
- (40) Escudier, B.; Szczylik, C., and Eisen, T. Randomized phase III trial of the Raf kinase and VEGFR inhibitor sorafenib (BAY 43-9006) in patients with advanced renal cell carcinoma (RCC). *J Clin Oncol*. **2005**, 23 (SUPPL.).
- (41) Griffith, E. C.; Su, Z.; Turk, B. E.; Chen, S.; Chang, Y. H.; Wu, Z.; Biemann, K., and Liu, J. O. Methionine aminopeptidase (type 2) is the common target for angiogenesis inhibitors AGM-1470 and ovalicin. *Chemistry and Biology*. **1997**, 4 (6), 461-471.
- (42) Gagliardi, A.; Hadd, H., and Collins, D. C. Inhibition of angiogenesis by suramin. *Cancer research*. **1992**, 52 (18), 5073-5075.
- (43) Waltenberger, J.; Mayr, U.; Frank, H., and Hombach, V. Suramin is a potent inhibitor of vascular endothelial growth factor. A contribution to the molecular basis of its antiangiogenic action. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. **1996**, 28 (7), 1523-1529.
- (44) Kaur, M.; Reed, E.; Sartor, O.; Dahut, W., and Figg, W. D. Suramin's development: What did we learn? *Investigational New Drugs*. **2002**, 20 (2), 209-219.
- (45) Mirza, M. R.; Jakobsen, E.; Pfeiffer, P.; Lindebjerg-Clasen, B.; Bergh, J., and Rose, C. Suramin in non-small cell lung cancer and advanced breast cancer. Two parallel phase II studies. *Acta Oncologica*. **1997**, 36 (2), 171-174.
- (46) Ciomei, M.; Pastori, W.; Mariani, M.; Sola, F.; Grandi, M., and Mongelli, N. New sulfonated distamycin A derivatives with bFGF complexing activity. *Biochemical Pharmacology*. **1994**, 47 (2), 295-302.
- (47) Meyers, M. O.; Gagliardi, A. R.; Flattmann, G. J.; Su, J. L.; Wang, Y. Z., and Woltering, E. A. Suramin analogs inhibit human angiogenesis in vitro. *Journal of Surgical Research*. **2000**, 91 (2), 130-134.

- (48) Schneider, G. P.; Salcedo, R.; Dong, H. F.; Kleinman, H. K.; Oppenheim, J. J., and Howard, O. M. Z. Suradista NSC 651016 inhibits the angiogenic activity of CXCL12-stromal cell-derived factor 1 α . *Clinical Cancer Research*. **2002**, 8 (12), 3955-3960.
- (49) Fernández-Tornero, C.; Lozano, R. M.; Redondo-Horcajo, M.; Gómez, A. M.; López, J. C.; Quesada, E.; Uriel, C.; Valverde, S.; Cuevas, P.; Romero, A., and Giménez-Gallego, G. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *The Journal of biological chemistry*. **2003**, 278 (24), 21774-21781.
- (50) Liekens, S.; Neyts, J.; ve, B., and De Clercq, E. The sulfonic acid polymers PAMPS [Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)] and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology Research*. **1997**, 9 (4), 173-181.

II. Objetivos

La búsqueda de nuevos materiales para la lucha contra el crecimiento de tumores es un campo en continuo desarrollo y de un interés creciente dada la gran cantidad de población que se ve afectada^b. La angiogénesis es un proceso clave en el desarrollo de tumores sólidos, por lo que su inhibición está demostrando ser una vía bastante eficaz en la lucha contra éstos.

El principal objetivo de esta tesis doctoral es la obtención y el estudio de nuevas macromoléculas con una alta capacidad antiangiogénica y baja. Las moléculas obtenidas deben mantener una actividad considerable sin presentar una elevada toxicidad. Para alcanzar dicha finalidad se han planteado los siguientes objetivos:

1. Síntesis y caracterización de un nuevo monómero metacrílico derivado del ácido 5-amino-2-naftalensulfónico.
2. Síntesis y caracterización de sistemas copoliméricos basados en el monómero derivado del ANSA y en al ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico. Estudio de la reacción de copolimerización.
3. Estudio de las interacciones existentes entre el FGF y los distintos sistemas poliméricos sintetizados.
4. Estudio de la toxicidad y capacidad de la inhibición de la mitogénesis inducida por el bFGF.

^b Más de 100 000 muertes al año por tumores en España según el INE.

II. Objetivos

5. Desarrollo de un ensayo tridimensional *in vitro* para el estudio de la inhibición de la angiogénesis. Estudio de la inhibición de la angiogénesis *in vitro* por parte de los distintos polímeros sintetizados.
6. Estudio de la inhibición de la angiogénesis *in vivo* de los polímeros con mayor actividad *in vitro*.

III. Síntesis y caracterización de polí- meros portadores de grupos sulfónicos

III.1 Introducción

Los numerosos métodos de copolimerización existentes permiten la obtención de materiales con diferentes propiedades debido a las amplias posibilidades que esta técnica admite. En el presente capítulo, se describen la síntesis y caracterización de dos tipos de familias poliméricas portadoras de grupos sulfónicos: ANSA y AMPS. Se han preparado copolímeros de acrilato de butilo (AB) y *N*-vinilpirrolidona (VP) con AMPS y con un derivado metacrílico del ANSA (MANSA), intentando obtener de esta forma dos familias de copolímeros con distintas propiedades en medio acuoso (Figura III.1).

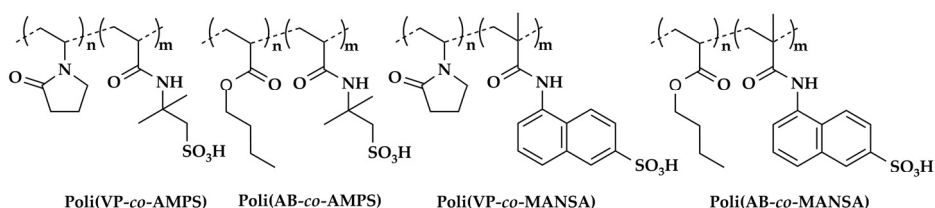


Figura III.1. Esquema de las estructuras químicas de los copolímeros sintetizados.

Los polímeros preparados en este trabajo se han sintetizado mediante polimerización por adición o en cadena. En este tipo de polimerización, las especies activas son radicales libres y la polimerización se produce por adición de los radicales al doble enlace del monómero acrílico. Los monómeros se incorporan a la cadena macromolecular en cantidades que dependen de su reactividad y de la concentración relativa en la mezcla de reacción (como se estudiará en el Capítulo IV).

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

La copolimerización permite la síntesis de polímeros con propiedades “a la carta” mediante la combinación de monómeros existentes con monómeros de nueva síntesis, la variación de la cantidad relativa de éstos en el medio de reacción, la disposición de las diferentes unidades en la cadena polimérica y los diferentes métodos de procesado.

III.1.1 Descripción de los monómeros

Los polímeros sintetizados en este trabajo presentan capacidad para inhibir la angiogénesis gracias a la presencia de grupos sulfónicos en su estructura. Estos grupos sulfónicos han sido introducidos en las macromoléculas mediante la incorporación de dos monómeros: uno comercial (AMPS) y otro de nueva síntesis (MANSA), que se han copolimerizado con otros dos monómeros con distintas propiedades en medio acuoso para obtener varias familias de copolímeros con diferentes propiedades. A continuación se describen los distintos comonómeros utilizados en el presente trabajo:

Ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico. Éste es un monómero aniónico portador de un grupo sulfónico (ácido fuerte) ionizado en prácticamente todo el rango de pH¹. Se suele emplear en la síntesis de hidrogeles para uso biomédico y para la liberación controlada de fármacos²⁻⁶. Su carácter iónico le permite formar polielectrolitos para su uso como conductor iónico⁷. Su homopolímero es biocompatible y debido a su naturaleza sulfónica y a su mimetismo con la heparina posee una gran actividad antitrombogénica y antiangiogénica⁸⁻¹⁰.

Ácido 5-aminonaftalen-2-sulfónico. Es un derivado del ácido naftalensulfónico cuya estructura química, con un grupo sulfónico y un grupo amino, le confiere la característica de zwitterión (compuesto químico eléctricamente neutro pero que tiene cargas formales positivas y negativas sobre átomos diferentes). Debido a esta propiedad, posee una elevada solubilidad en agua y bastante baja en muchos disolventes orgánicos de carácter apolar y se ha estudiado su uso en aplicaciones electrónicas y optoelectrónicas¹¹⁻¹³.

Su capacidad antiangiogénica se debe a su similitud con la estructura de suradistas y suraminas y ha sido previamente estudiada¹⁴. Un derivado metacrílico se sintetizó en nuestro laboratorio mediante reacciones orgánicas convencionales y las condiciones experimentales más apropiadas para conseguir rendimientos satisfactorios.

N-vinilpirrolidona. Es un derivado vinílico de la pirrolidona muy utilizado en la formulación de biomateriales debido a su alta biocompatibilidad¹⁵. Actualmente está siendo utilizado en un amplio abanico de aplicaciones biomédicas, desde la síntesis de hidrogeles o nanopartículas para la liberación de fármacos hasta su uso como componente de cementos para usos dentales¹⁶⁻¹⁹. La VP es un monómero hidrofílico, lo que va a mejorar la hidrosolubilidad de los copolímeros.

Acrilato de butilo. Es un monómero acrílico muy hidrofóbico. A pesar de ser un monómero altamente tóxico, cuando se encuentra polimerizado pierde dicha toxicidad permitiendo su uso como biomaterial²⁰⁻²¹. Al igual que en el caso anterior, el AB ha sido ampliamente es-

tudiado y es muy utilizado en el campo de los biomateriales para proporcionar hidrofobia a los polímeros y aumentar la flexibilidad de polímeros de alto peso molecular²²⁻²⁶.

III.2 Materiales y métodos

III.2.1 Reactivos

El ácido 5-aminonaftalen-2-sulfónico (Sigma-Aldrich) y el ácido 2-acrilamido-2-metilpropanosulfónico (Avocado) se utilizaron sin purificación previa. La *N*-vinilpirrolidona (Sigma-Aldrich) se destiló en atmósfera inerte y el acrilato de butilo (Fluka) a presión reducida. El cloruro de metacrililo (Sigma Aldrich) se destiló cuidadosamente a vacío justo antes de su utilización. La trietilamina (Sharlau) y el dioxano (Panreac) se secaron sobre hidróxido potásico manteniéndolos a reflujo durante 24 horas y después se destilaron a presión atmosférica y se almacenaron sobre tamiz molecular (4Å). El 2,2'-azo-bis-isobutironitrilo, AIBN (Fluka) se utilizó previa recristalización en metanol (punto de fusión 104 ± 1 °C). El resto de reactivos se utilizaron sin purificación previa por ser de grado extrapuros.

III.2.2 Síntesis del derivado metacrílico del ácido 5-aminonaftalen-2-sulfónico

La reacción se llevó a cabo en dos pasos (Figura III. 2):

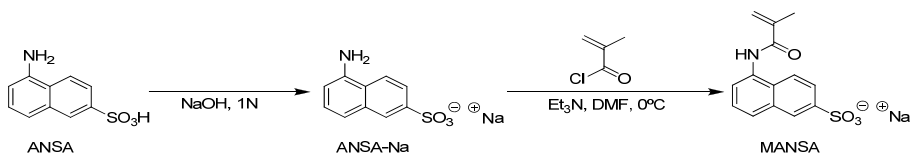


Figura III. 2. Esquema de la síntesis del MANSA

1. *Formación de la sal sódica del ANSA:* En primer lugar se suspendieron 10 g de ANSA en 100 ml de agua y se mantuvo con agitación en un baño de hielo. A esta suspensión se le añadió una disolución de hidróxido sódico (1 N) hasta alcanzar pH neutro (solubilización completa del ANSA). Esta disolución fue congelada y liofilizada para obtener un polvo fino correspondiente a la sal sódica del ANSA.
2. *Reacción con cloruro de metacriloilo:* Se disolvieron 2 mmol de la sal sódica del ANSA (5 g) y trietilamina (2,06 g) en 50 ml de DMF. Esta disolución se mantuvo con agitación magnética en un baño de hielo y se añadió, gota a gota, cloruro de metacriloilo mediante un embudo de adición compensado. La reacción se mantuvo bajo corriente de nitrógeno y agitación magnética durante 24 horas. Pasado este tiempo, el producto de reacción se filtró para eliminar el clorhidrato de trietilamina formado y se purificó el producto mediante columna cromatográfica emple-

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

ando una mezcla de diclorometano/metanol como eluyente y Florisil® (Sigma) como fase estacionaria.

III.2.3 Síntesis de los copolímeros

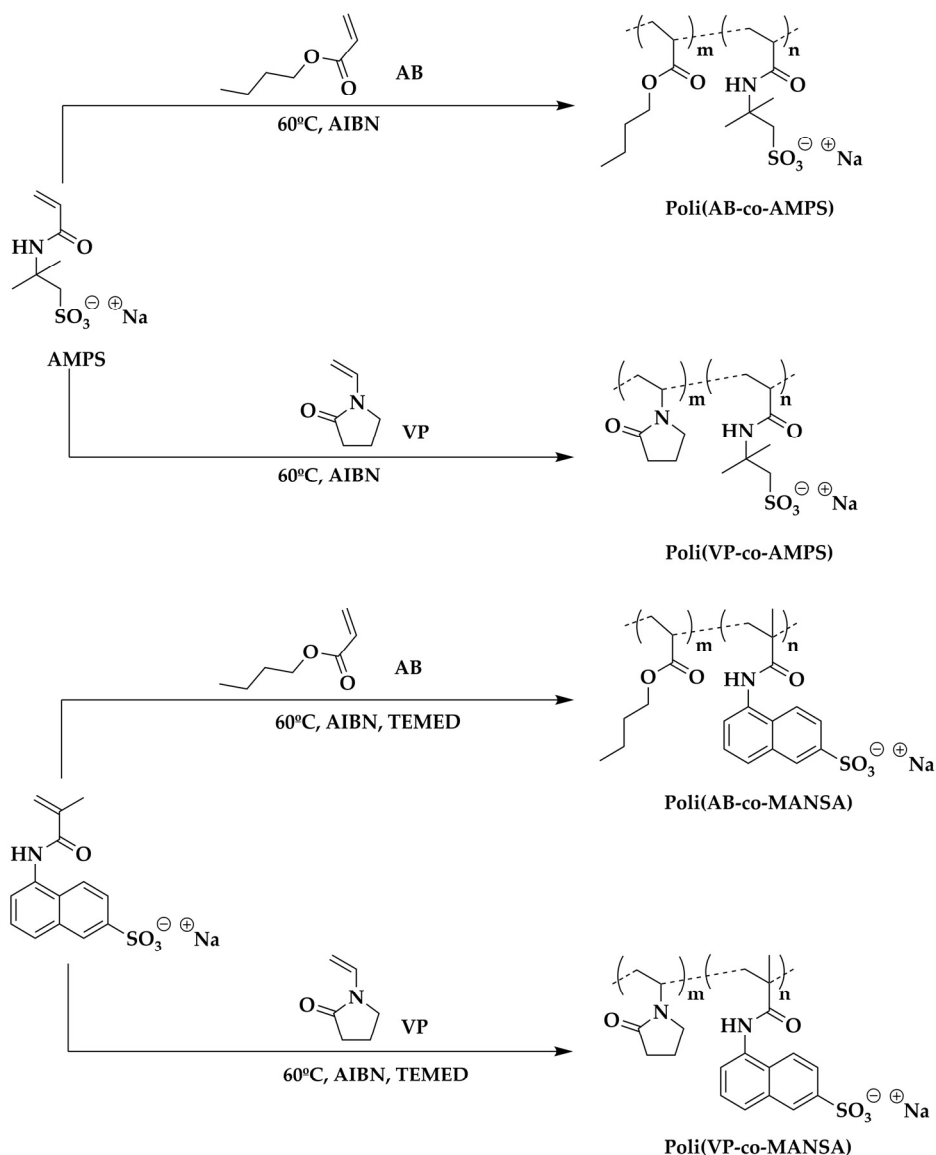


Figura III. 3. Esquema de síntesis de los distintos copolímeros.

Se sintetizaron homopolímeros y copolímeros de los sistemas AB-AMPS, VP-AMPS, AB-MANSA y VP-MANSA (Figura III. 3) a conversión total y con distintas composiciones molares. Estos materiales se obtuvieron por polimerización radical en disolución, utilizando dioxano: agua (80:20) como disolvente, con una concentración total de monómeros de 0,5 M y a 60 °C. Previo a la reacción, las disoluciones fueron desoxigenadas bajo una corriente de nitrógeno durante 30 minutos. En los sistemas con AMPS, se utilizó como iniciador AIBN a una concentración del 1%. En el caso del MANSA, como sistema iniciador se utilizó AIBN al 1% y como catalizador TEMED al 0,5 %.

III.2.4 Caracterización general de los sistemas poliméricos

Todos los sistemas sintetizados se han caracterizado mediante técnicas espectroscópicas, cromatográficas y calorimétricas.

Técnicas espectroscópicas

Los espectros de **resonancia magnética nuclear (RMN)** de los diferentes copolímeros se obtuvieron disolviéndolos en D₂O, DMSO-d₆ ó CD₃OD, dependiendo de su solubilidad, en concentraciones de 10 mg/ml, para los espectros de ¹H-RMN, y 100 mg/ml, para los espectros de ¹³C-RMN. Todos los espectros se registraron en un equipo Inova-400 trabajando a una frecuencia de 400 MHz, empleando TMS como referencia externa. Los espectros de IR de los copolímeros se obtuvieron mediante reflexión total atenuada (ATR-FTIR) en un equipo Perkin-Elmer (Spectrum One). Los espectros se registraron con 32 barridos y una resolución de 4 cm⁻¹.

Técnicas cromatográficas

Mediante la técnica de **cromatografía de permeación en gel (GPC)** se determinó el peso molecular promedio en número (M_n), peso molecular promedio en peso (M_w) y polidispersidad (M_w/M_n) de los distintos copolímeros sintetizados. Para los polímeros derivados del AMPS se utilizó un equipo *Simadzu CTO 20A* acoplado a tres columnas (Varian Inc.) en serie de distintos tamaños de poro: PL aquagel-OH 30 (100 a 30,000 g/mol), 40 (10,000 a 200,000 g/mol) y 50 (50,000 a 1,000,000 g/mol) y a un detector de índice de refracción (RID 10A). Como eluyente se empleó una disolución tamponada a pH 9 de NaNO_3 0,2 M y NaH_2PO_4 0,01 M a una velocidad de flujo de 1 ml/min y una concentración 2 mg/ml obteniéndose el diagrama de GPC en función del tiempo. Los datos fueron analizados usando un calibrado con muestras monodispersas de polietilenglicol con pesos moleculares comprendidos entre 1000 y 500000 g/mol (Scharlab).

Los copolímeros derivados del ANSA se analizaron en DMF (grado GPC con 0,1% m/v de LiBr) en un equipo *Perkin-Elmer* equipado con una bomba *Perkin-Elmer Isocratic LC pump 250* conectado a un detector de índice de refracción. Las muestras se eluyeron utilizando tres columnas en serie PL-gel de poliestireno-divinilbenzeno de tamaño de poro 10^3 , 10^4 y 10^5 Å (Varian Inc.). Los datos fueron analizados usando un calibrado con muestras monodispersas de poliestireno con pesos moleculares comprendidos entre 1340 a 370000 g/mol.

Técnicas Calorimétricas

Se han llevado a cabo medidas de **calorimetría diferencial de barrido (DSC)** en un aparato Perkin-Elmer DSC-7 purgado con nitrógeno en la celda de análisis y calibrado con patrones de indio y zinc. Las muestras, aproximadamente 12 mg, se cerraron herméticamente en cápsulas de aluminio y se sometieron a un programa de calentamiento de 10 °C/min. La T_g se definió como el punto de inflexión de la transición vítrea del segundo barrido.

Las **medidas termogravimétricas (TGA)** se realizaron en una termobalanza Metler-TG50. Los experimentos se realizaron bajo un flujo de nitrógeno de 50 ml/min y a una velocidad de calentamiento de 10 °C/min, desde 40 a 550 °C.

III.3 Resultados y discusión

III.3.1 Síntesis de monómeros y polímeros

El derivado metacrílico del ANSA (MANSA) se sintetizó mediante reacción del grupo amino con el cloruro de metacriloilo para dar lugar a la correspondiente amida (Figura III. 2). El rendimiento de la reacción fue mayor del 70% y el monómero se consiguió en forma de polvo rojizo.

La polimerización radical se llevó a cabo en las condiciones experimentales descritas anteriormente; y dio lugar a rendimientos de prácticamente el 100 % en el caso de los sistemas con AMPS y del 25 % en los sistemas con MANSA.

III.3.2 Caracterización de los productos de reacción

Caracterización espectroscópica

Mediante los espectros de resonancia magnética nuclear y espectroscopía infrarroja se caracterizaron los productos obtenidos en las distintas reacciones llevadas a cabo (síntesis del monómero y polimerizaciones). Se determinó la ausencia de productos de partida y/o de reacciones secundarias, se comprobó la efectividad del proceso de purificación, y se determinó la concentración molar de comonómeros dentro del polímero.

En la Figura III.4 se muestra el espectro del derivado metacrílico del ANSA con la asignación de los protones característicos que verifican la correcta síntesis del monómero.

En las Figura III.5 y Figura III.6 se muestran los espectros de ^1H -RMN de los monómeros y de un copolímero representativo de los sistemas con AMPS, con la asignación de cada una de las señales con sus correspondientes hidrógenos.

En estos espectros, la formación de polímero se confirma mediante la desaparición de las señales de los protones vinílicos correspondientes de los monómeros: AB (6,36 ppm; 6,10 ppm; 5,79ppm), VP (7,08 ppm; 4,45 ppm; 4,42 ppm) y AMPS (6,12 ppm; 5,59 ppm; 5,51 ppm). Esto confirma el progreso de la reacción y la ausencia de monómero residual; además, se observa el ensanchamiento de las señales propio de su carácter macromolecular.

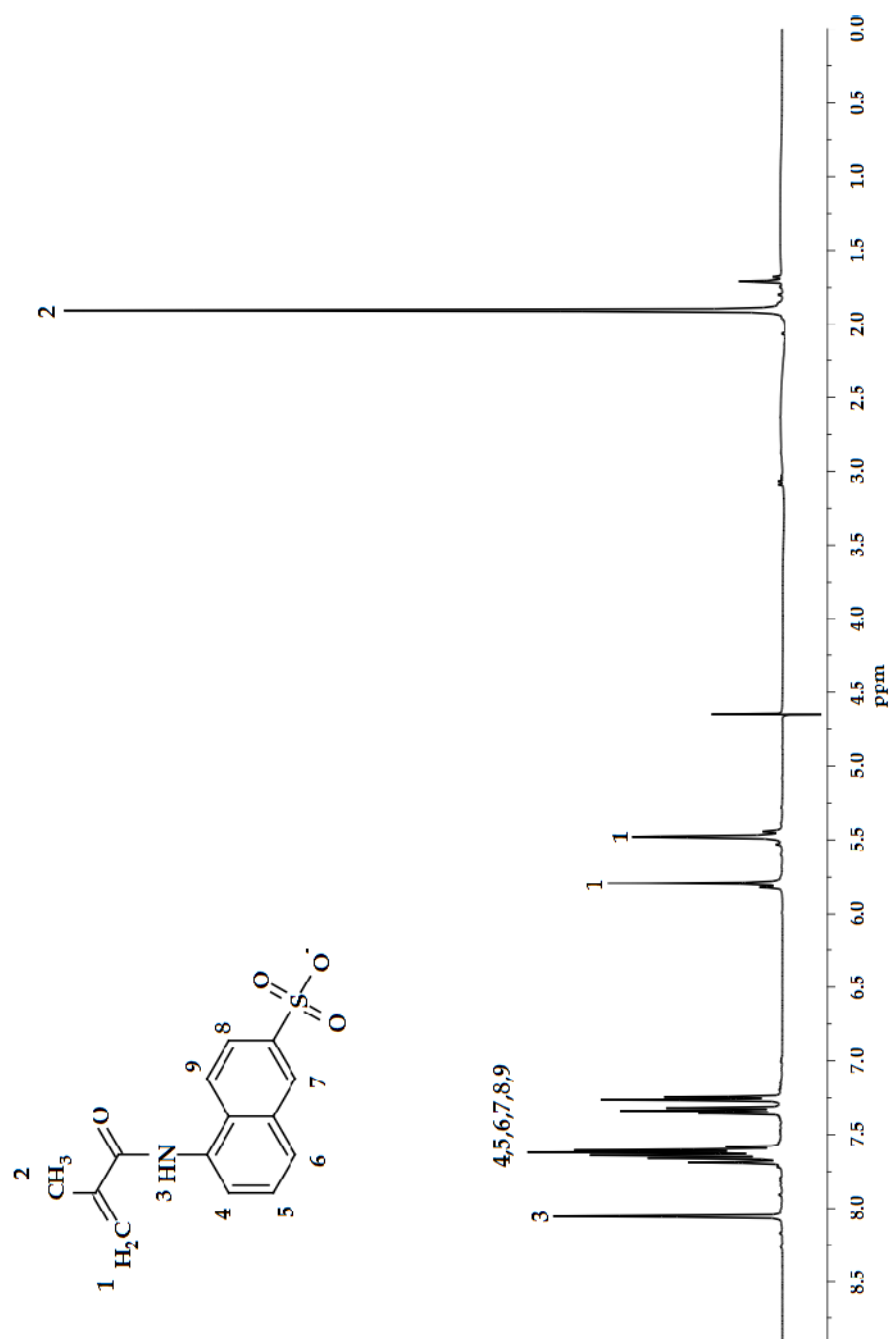


Figura III.4. Espectro de ^1H -RMN del derivado metacrílico del ANSA.

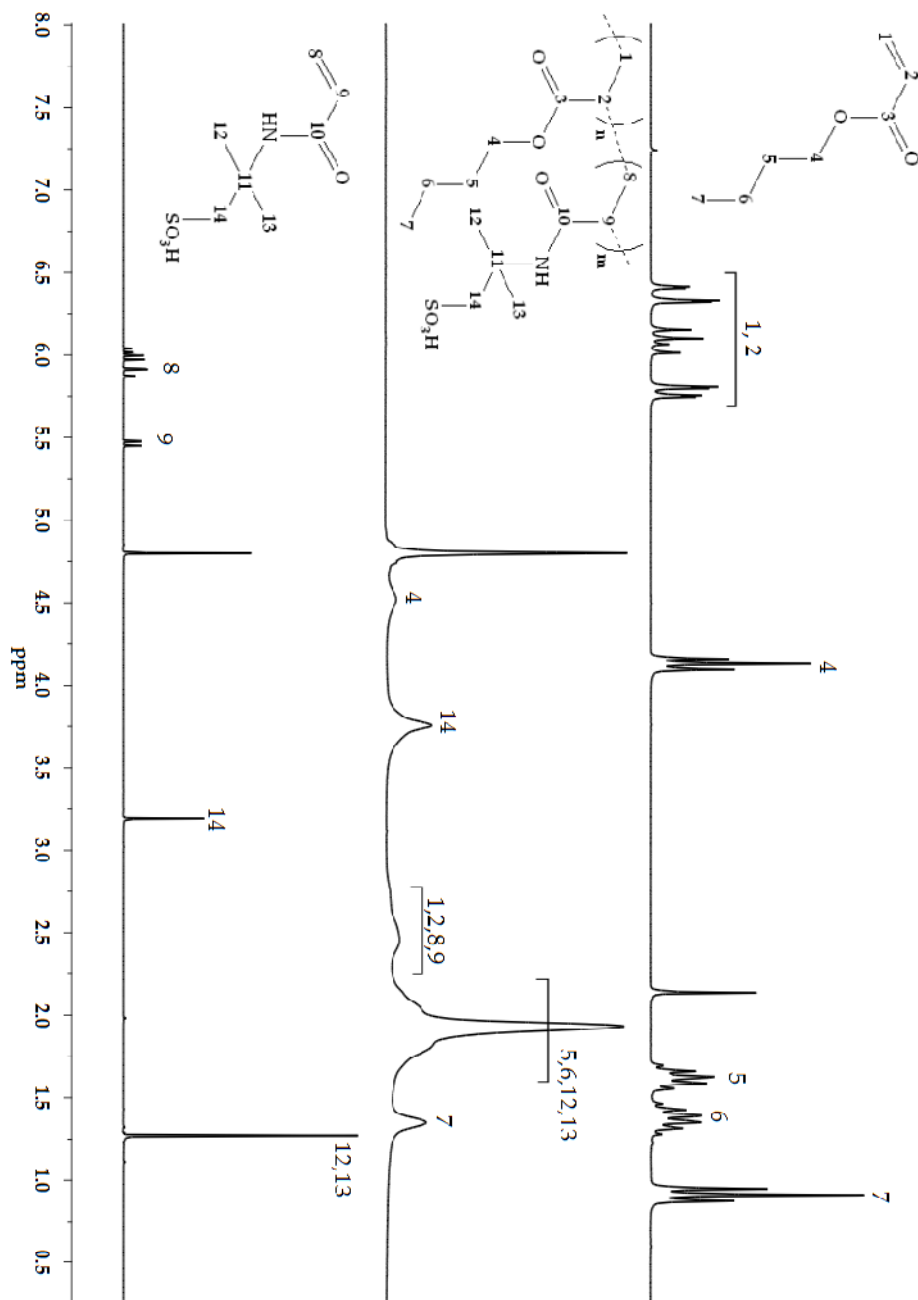


Figura III.5. Espectros de ^1H -RMN de los monómeros de AB y AMPS, y del copolímero poli(AB-co-AMPS) (50:50).

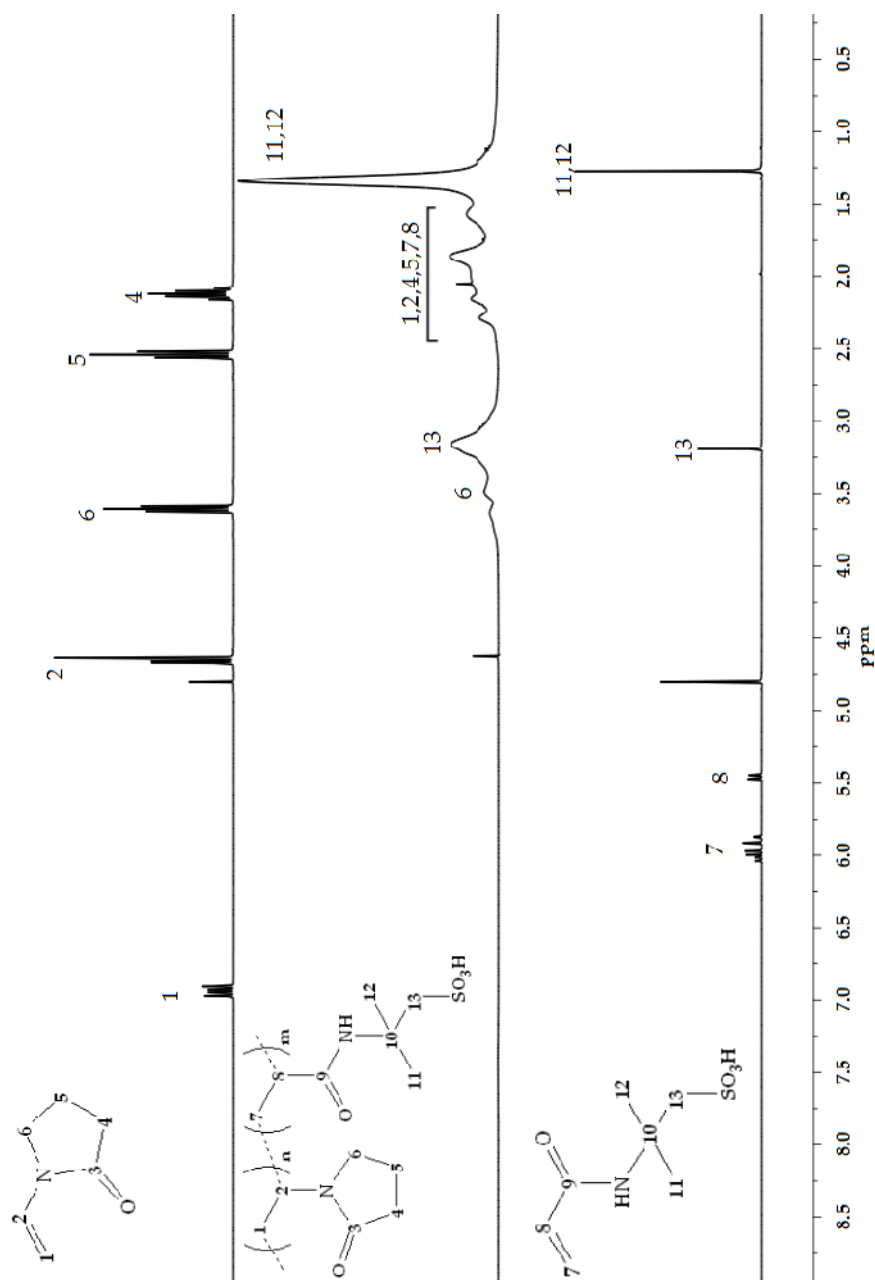


Figura III.6. Espectros de ^1H -RMN de los monómeros de AMPS y VP, y del copolímero poli(VP-co-AMPS) (50:50).

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

En las Figuras III. 7 y III. 8 se muestran los espectros de ^{13}C -RMN, en los que se observa de igual manera la caracterización de los monómeros y un polímero característico. En este caso, la desaparición del doble enlace metacrílico, como consecuencia de la reacción de polimerización, da lugar a un desplazamiento en la señal de los correspondientes carbonos: AB(128 ppm, 132 ppm), VP (97 ppm, 128 ppm) y AMPS (126 ppm, 130ppm).

El cálculo de las composiciones de los copolímeros se ha realizado a partir de los valores de las integrales normalizadas de señales características de cada comonómero en ^1H -RMN. En los copolímeros poli(AB-co-AMPS) se ha utilizado la señal 14 (3,5 – 4 ppm), correspondiente a dos protones del AMPS; y la señal 7 (1 – 1,4 ppm), correspondiente a tres protones del AB. Para el cálculo de las composiciones molares de los copolímeros poli(VP-co-AMPS) se han utilizado las señales 6 y 13 (3 – 3,9 ppm), correspondientes a dos protones de la VP y dos del AMPS; y las señales 11 y 12 (1 – 1,4 ppm), correspondientes a seis protones del AMPS. Con los valores de dichas integrales se han calculado las composiciones que se muestran en las Tablas III. 1 y III. 2.

Poli(AB-co-AMPS)	(25:75)	(50:50)	(65:35)	(75:25)
f_{AMPS}	0,75	0,50	0,35	0,25
F_{AMPS}	0,72	0,50	0,36	0,23
Rendimiento (%)	87	70	81	73

Tabla III.1. Composiciones molares y rendimientos de reacción del sistema poli(AB-co-AMPS). f_{AMPS} : Composición de AMPS en alimentación, F_{AMPS} : composición de AMPS en el copolímero.

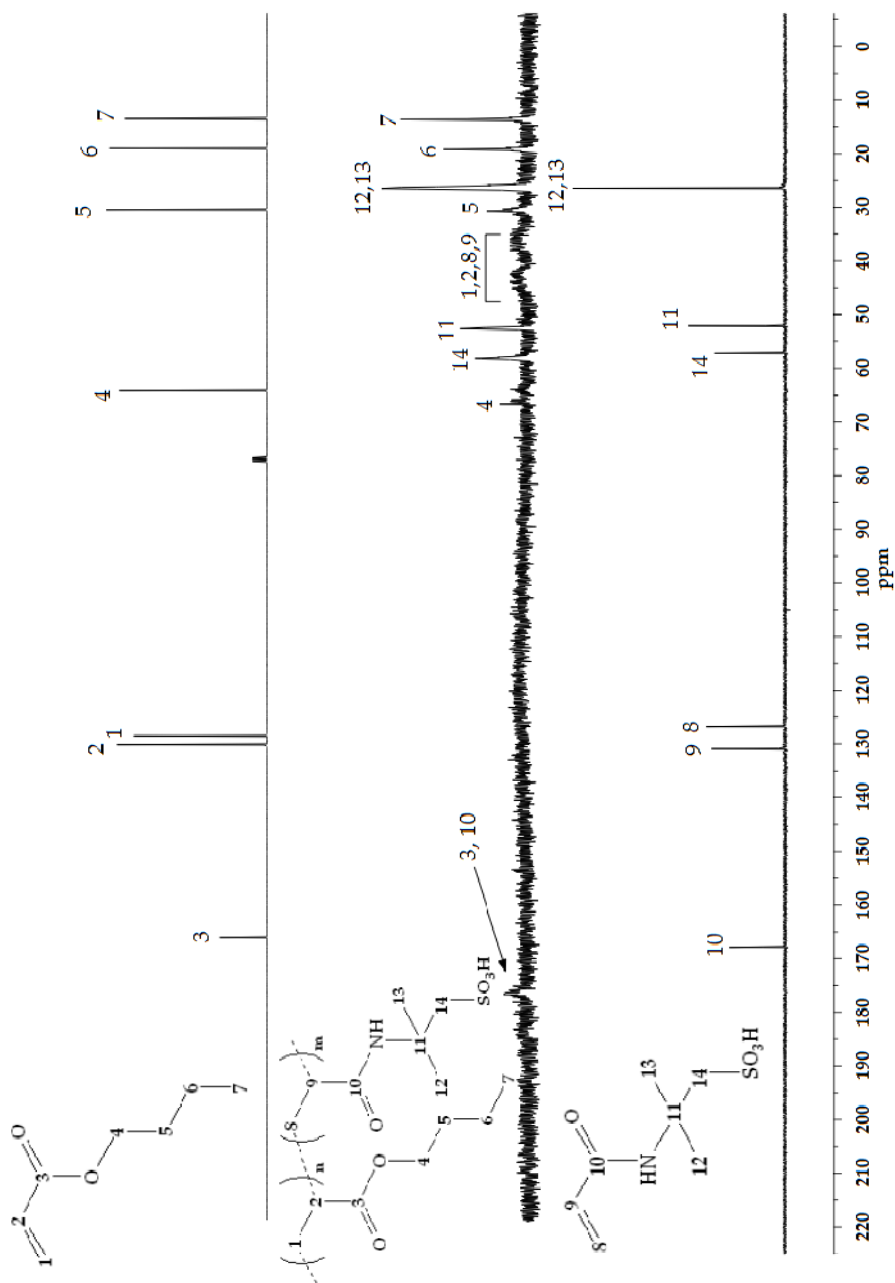


Figura III.7. Espectros de ^{13}C -RMN de los monómeros de AB y AMPS, y del copolímero poli(AB-co-AMPS) (50:50).

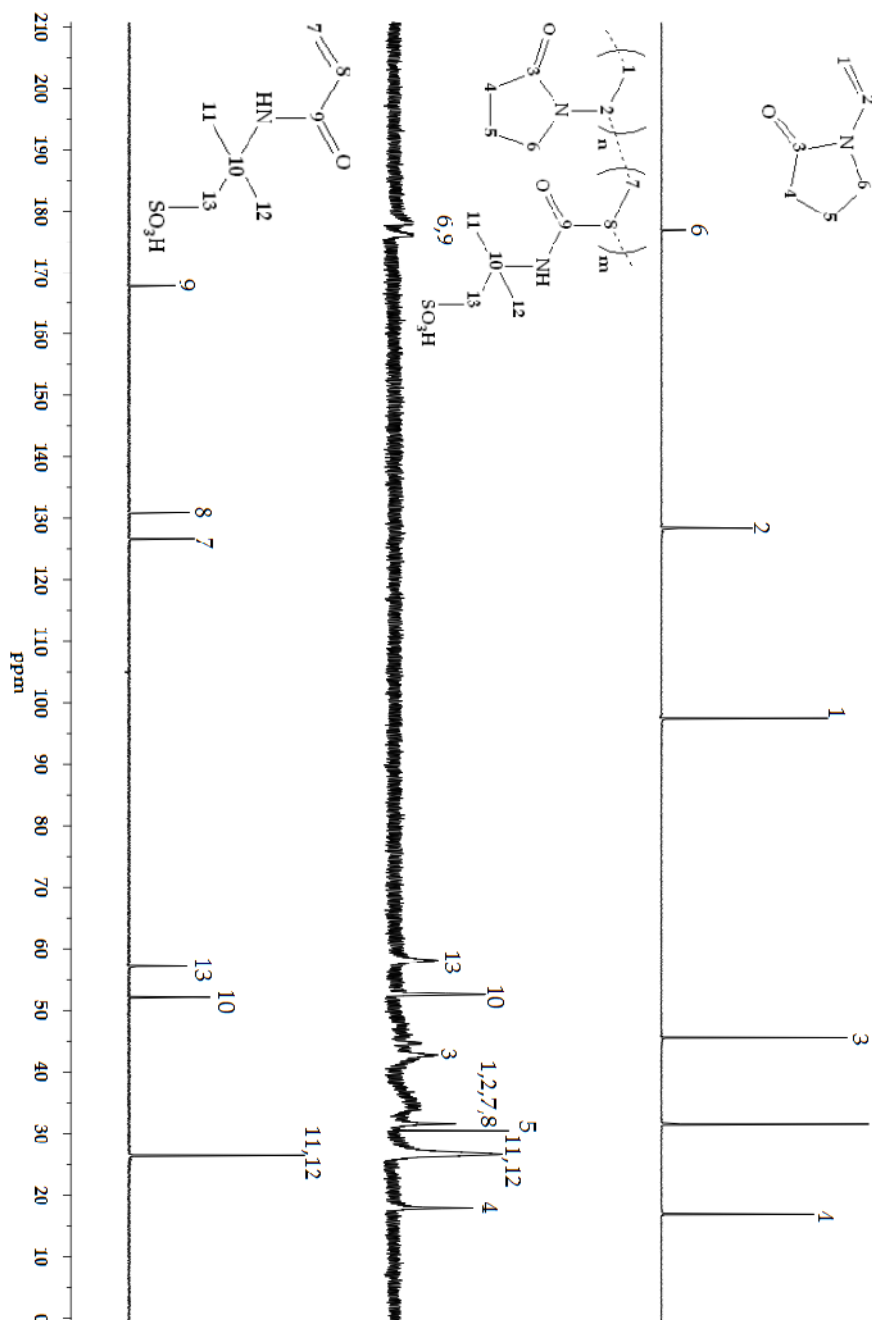


Figura III.8. Espectros de ^{13}C -RMN de los monómeros de VP y AMPS, y del copolímero poli(VP-co-AMPS) (50:50).

Poli(VP-<i>co</i>-AMPS)	(30:70)	(50:50)	(60:40)	(70:30)
f_{AMPS}	0,70	0,50	0,40	0,30
F_{AMPS}	0,72	0,53	0,45	0,30
Rendimiento (%)	82	83	80	85

Tabla III.2. Composiciones molares y rendimientos de reacción del sistema poli(VP-*co*-AMPS). f_{AMPS}: Composición de AMPS en alimentación, F_{AMPS}: composición de AMPS en el copolímero.

En las Figuras III. 9 y III. 10 se pueden observar los espectros de ¹H-RMN de los copolímeros basados en el MANSA. Como en el caso anterior, la formación de polímeros se pone de manifiesto mediante la desaparición de las señales de los dobles enlaces correspondientes a los monómeros de AB (6,36 ppm; 6,10 ppm; 5,79 ppm), VP (7,08 ppm; 4,45 ppm; 4,42 ppm) y MANSA (5,86 ppm y 5,54 ppm). Esto confirma el progreso de la reacción y la ausencia de monómero residual, además de observarse el ensanchamiento de las señales propio del carácter macromolecular.

Para el cálculo de las composiciones de los copolímeros se han utilizado las señales de los anillos aromáticos (7,25 – 8,25 ppm) que corresponden a cinco protones del MANSA, la señal 4 (3,7 – 4,1 ppm) correspondientes a dos protones del AB en el caso del sistema poli(AB-*co*-MANSA) y las señales 1, 2 y 6 (3 – 3,9 ppm) correspondientes a seis protones de la VP en el caso del sistema poli(VP-*co*-MANSA).

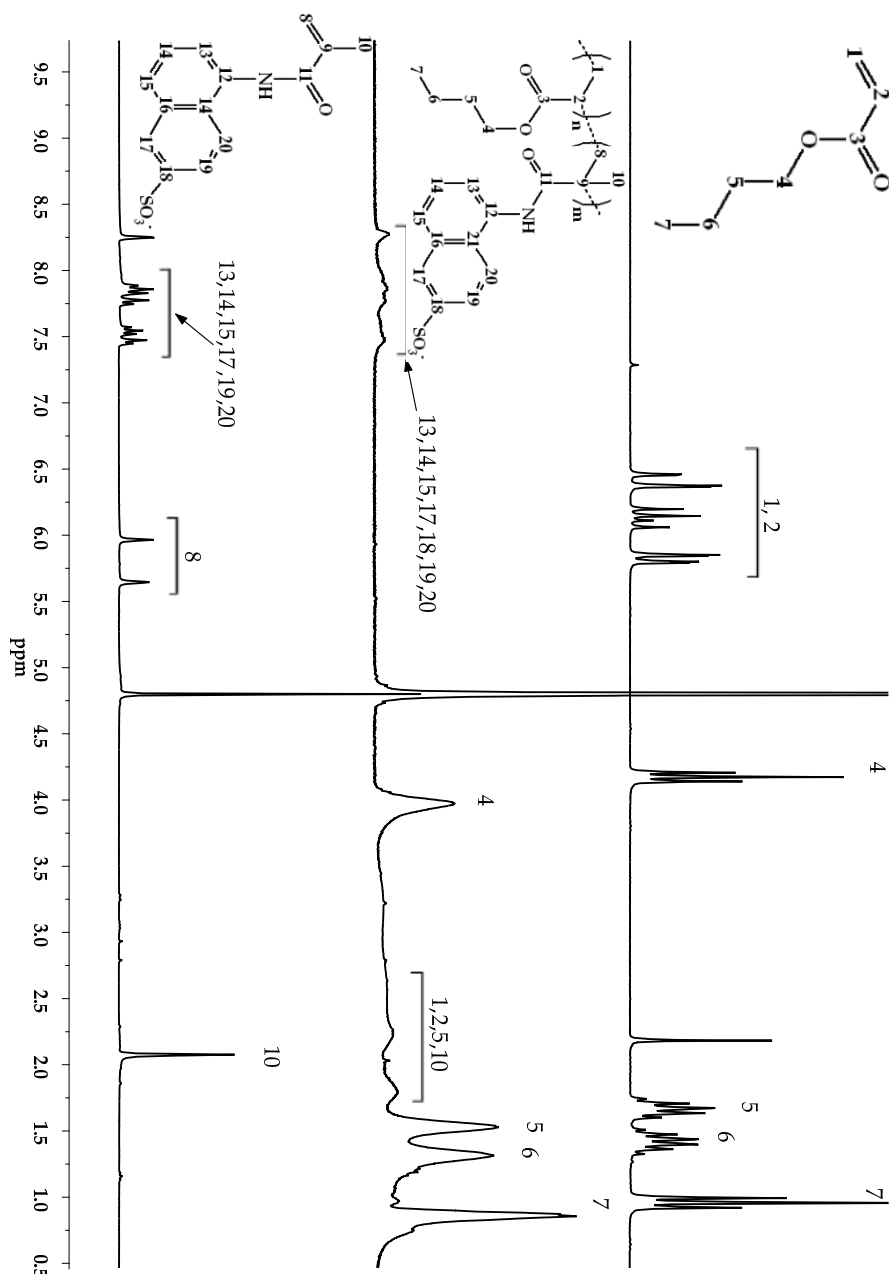


Figura III.9. Espectros de ^1H -RMN de los monómeros de AB y MANSA, y del copolímero poli(AB-co-MANSA) (50:50).

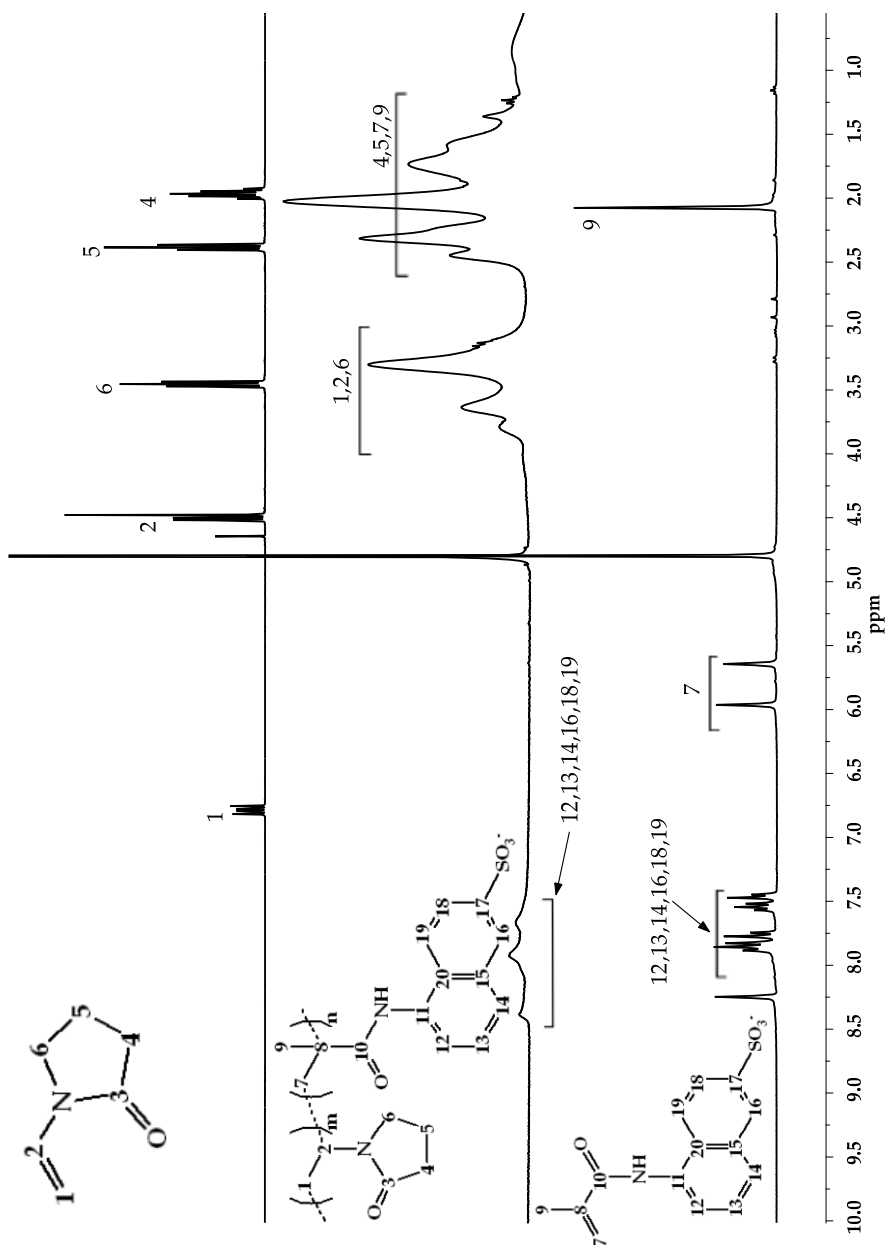


Figura III.10. Espectros de ^1H -RMN de los monómeros de VP y MANSA, y del copolímero poli(VP-co-MANSA) (50:50).

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

Así se han calculado las composiciones molares de los distintos polímeros sintetizados (Tablas III. 3 y III. 4).

Poli(AB- <i>co</i> -MANSA)	(30:70)	(60:40)	(70:30)
f_{MANSA}	0,70	0,40	0,30
F_{MANSA}	0,20	0,18	0,11
Rendimiento (%)	25	29	31

Tabla III.3. Composiciones molares y rendimientos de reacción del sistema poli(AB-*co*-MANSA). f_{MANSA} : Composición de MANSA en alimentación, F_{MANSA} : composición de MANSA en el copolímero.

Poli(VP- <i>co</i> -MANSA)	(50:50)	(60:40)	(80:20)
f_{MANSA}	0,50	0,40	0,20
F_{MANSA}	0,27	0,15	0,10
Rendimiento (%)	23	19	41

Tabla III.4. Composiciones molares y rendimientos de reacción del sistema poli(VP-*co*-MANSA). f_{MANSA} : Composición de MANSA en alimentación, F_{MANSA} : composición de MANSA en el copolímero.

Los copolímeros basados en MANSA incorporan menos cantidad de este monómero en el copolímero debido a la estabilización del radical formado durante el proceso de polimerización. Dicha estabilización se debe a la presencia de electrones deslocalizados que estabilizan la formación del radical mediante una fuerte conjugación con el anillo aromático como se observa en la Figura III.11 y se estudiará en el Capítulo IV.

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

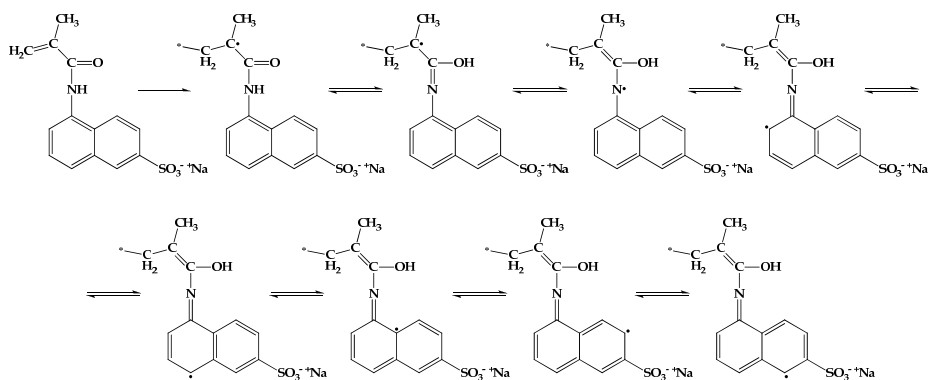


Figura III.11. La alta conjugación de la molécula permite la estabilización del radical formado durante la polimerización en cadena.

Los espectros FTIR de los copolímeros (Figuras III. 12, III. 13, III. 14 y III. 15) muestran las señales más significativas de los homopolímeros y copolímeros. En estos se observa la ausencia de picos olefínicos ($\nu_{C=C}$ a $1635\text{--}1620\text{ cm}^{-1}$) indicando la ausencia de monómero residual en las muestras caracterizadas.

En los espectros FTIR de los copolímeros se observan las bandas características correspondientes a cada comonómero: PAMPS (ν_{NH} a 3311 cm^{-1} , $\nu_{C=O}$ (amida I) a 1650 cm^{-1} , ν_{CN} y δ_{CNH} a 1551 cm^{-1} , $\delta_{C(CH_3)_2}$ a 1391 cm^{-1} , ν_{SO_2} a 1224 cm^{-1} y ν_{SO_3H} a 1021 cm^{-1}), PAB (ν_{CH_2} a 2960 cm^{-1} (simétricas) y 2875 cm^{-1} (asimétricas), $\nu_{C=O}$ a 1725 cm^{-1} y ν_{C-O-C} a 1160 cm^{-1}), PVP (ν_{CH_2} a 2934 cm^{-1} (asimétricas), $\nu_{C=O}$ (amida III) a 1654 cm^{-1} y δ_{CH_2} a 1445 cm^{-1}) y PMANSA ($\nu_{C=O}$ a 1650 cm^{-1} , ν_{CN} a 1640 cm^{-1} , δ_{CNH} a 1550 cm^{-1} y $\nu_{S=O}$ a 1180 cm^{-1}).

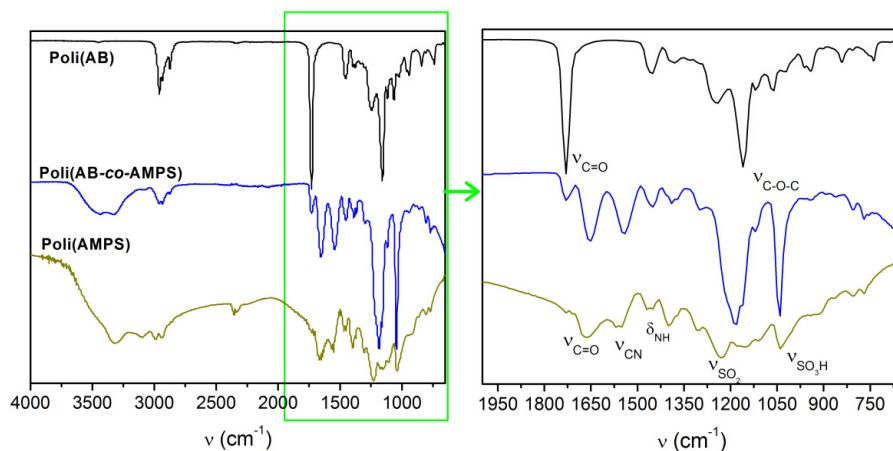


Figura III.12. Espectro ATR-FTIR del sistema Poli(AB-co-AMPS).

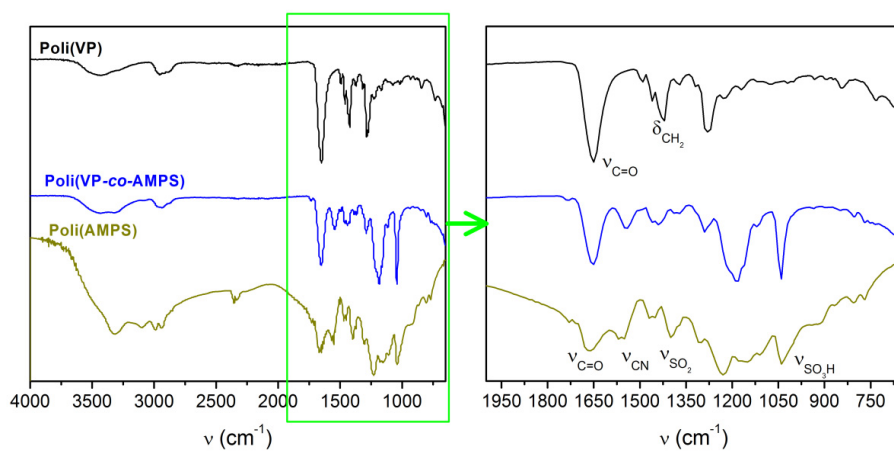


Figura III.13. Espectro ATR-FTIR del sistema Poli(VP-co-AMPS).

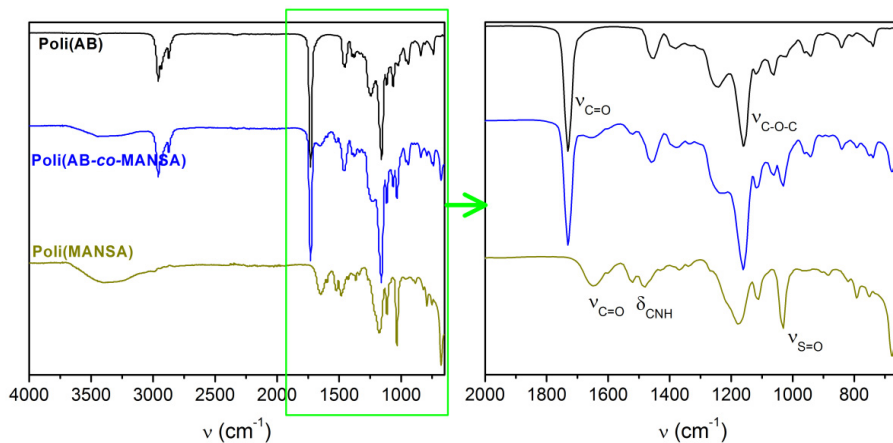


Figura III.14. Espectro ATR-FTIR del sistema Poli(AB-co-MANSA).

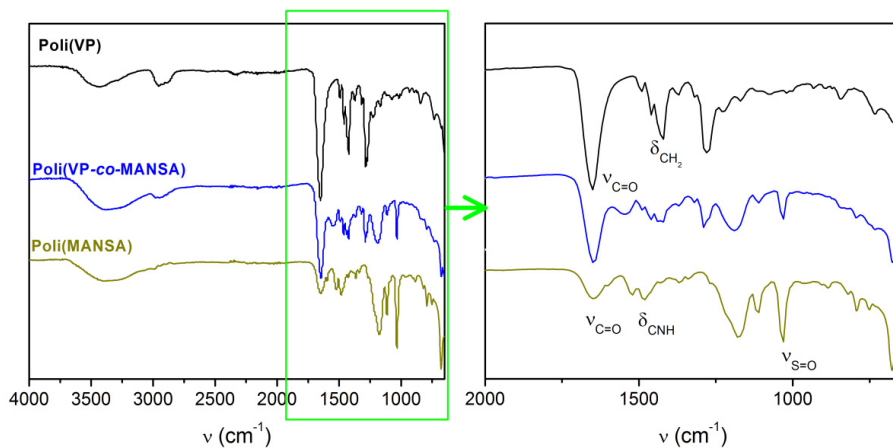


Figura III.15. Espectro ATR-FTIR del sistema Poli(VP-co-MANSA).

Caracterización cromatográfica

Las medidas de GPC nos proporcionan una aproximación de la distribución de pesos moleculares que se forman durante la reacción de copolimerización. Estas medidas realmente son de volumen molecular, pero el uso de estándares de peso molecular bien definido nos permiten obtener resultados de pesos moleculares con un error del $\pm 5\%$ ²⁷. Sin embargo, los copolímeros de AMPS y MANSA son fuertemente iónicos, por lo que su comportamiento hidrodinámico difiere de los sistemas no polielectrolíticos. Por todo ello, hay que considerar estos pesos moleculares como aparentes (Tablas III. 5, III. 6, III. 7 y III. 8):

Poli(AB-co-AMPS)	M_w	M_n	M_w/M_n
(25:75)	43700	27300	1,6
(50:50)	39600	23300	1,7
(65:35)	68300	36400	1,9
(75:25)	188900	72500	2,6

Tabla III.5. Pesos moleculares promedio en peso (M_w), en número (M_n) y polidispersidad (M_w/M_n) de los copolímeros poli(AB-co-AMPS).

Poli(VP-co-AMPS)	M_w	M_n	M_w/M_n
(30:70)	116800	52000	2,2
(50:50)	77900	34700	2,2
(60:40)	22100	15200	1,5
(70:30)	127800	46600	2,7

Tabla III. 6. Pesos moleculares promedio en peso (M_w), en número (M_n) y polidispersidad (M_w/M_n) de los copolímeros poli(VP-co-AMPS).

Poli(AB-<i>co</i>-MANSA)	M_w	M_n	M_w/M_n
(30:70)	17000	12200	1,40
(60:40)	20400	18600	1,10
(70:30)	40300	18500	2,18

Tabla III.7. Pesos moleculares promedio en peso (M_w), en número (M_n) y polidispersidad (M_w/M_n) de los copolímeros poli(AB-*co*-MANSA).

Poli(VP-<i>co</i>-MANSA)	M_w	M_n	M_w/M_n
(50:50)	11100	8500	1,30
(60:40)	11900	8800	1,35
(80:20)	27200	22800	1,19

Tabla III.8. Pesos moleculares promedio en peso (M_w), en número (M_n) y polidispersidad (M_w/M_n) de los copolímeros poli(VP-*co*-MANSA).

Como se estudió en el apartado anterior, la composición de los copolímeros del MANSA es prácticamente independiente de la composición de alimentación, ya que siempre forman copolímeros de composiciones similares. Además, el índice de polidispersidad de los copolímeros es relativamente bajo para un mecanismo de copolimerización radical; esto se debe a la estabilización de los macrorradicales cuando se incorpora a la cadena en propagación una molécula de MANSA produciendo una conjugación electrónica entre el grupo metacrílico y el anillo aromático (Figura III.11). A raíz de este efecto se obtienen pesos moleculares bajos (Tabla III.3 y Tabla III.4) que incrementan conforme disminuye la concentración de MANSA.

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

Otra consecuencia de la estabilización de los radicales cuando se incorpora una molécula de MANSA es el bajo índice de polidispersidad que se obtiene, que en casi todos los casos se encuentra bastante próximo a la unidad. Estos valores son característicos de una polimerización radical controlada mediante agentes de transferencia específicos (polimerización RAFT) como se describe en los trabajos de Rizzardo y colaboradores²⁸⁻³⁰. Según este tipo de copolimerización, el alto carácter ionizable y la alta conjugación electrónica del MANSA permiten la modulación de diferentes pasos en la polimerización, es decir, controla la propagación y la estabilización de los radicales libres generando copolímeros muy homogéneos y de peso molecular relativamente bajo para una polimerización radical, obteniendo una notable diferencia entre la composición en alimentación y en el copolímero.

Caracterización térmica

La **temperatura de transición vítrea (T_g)** nos da una idea de la flexibilidad de las cadenas poliméricas. Sus valores se han determinado mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) de los correspondientes homopolímeros y copolímeros. Las T_g de los diferentes homopolímeros se muestran en la Tabla III. 9.

	Poli(AB)	Poli(AMPS)	Poli(VP)	Poli(MANSA)
T_g (°C)	-40	157	106	122

Tabla III.9. Valores de T_g de los distintos homopolímeros.

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

- *Sistema poli(VP-co-AMPS)*: En la Tabla III. 10 se muestran los valores de la T_g de los diferentes copolímeros.

Poli(VP-co-AMPS)	(30:70)	(50:50)	(60:40)	(70:30)
T_g (°C)	135,2	120,9	115,8	113,8

Tabla III.10. Temperatura de transición vítrea de los copolímeros poli(VP-co-AMPS).

Los valores de los distintos copolímeros fueron analizados considerando la ecuación de Fox:

$$\frac{1}{T_g} = \frac{W_1}{T_{g1}} + \frac{W_2}{T_{g2}} \quad (\text{Ecuación III.1})$$

Estos valores de T_g se ajustan relativamente bien a la ecuación de Fox (Figura III. 16), lo que significa que la contribución de las unidades de AMPS a la flexibilidad de las cadenas de copolímero es aditiva, y por lo tanto las interacciones específicas en sistemas hidratados entre unidades VP y unidades AMPS vecinas se establecen después de completarse el proceso de hidratación como ha descrito Alencar de Queiroz y colaboradores en el caso de la dimetilacrilamida y la VP³¹.

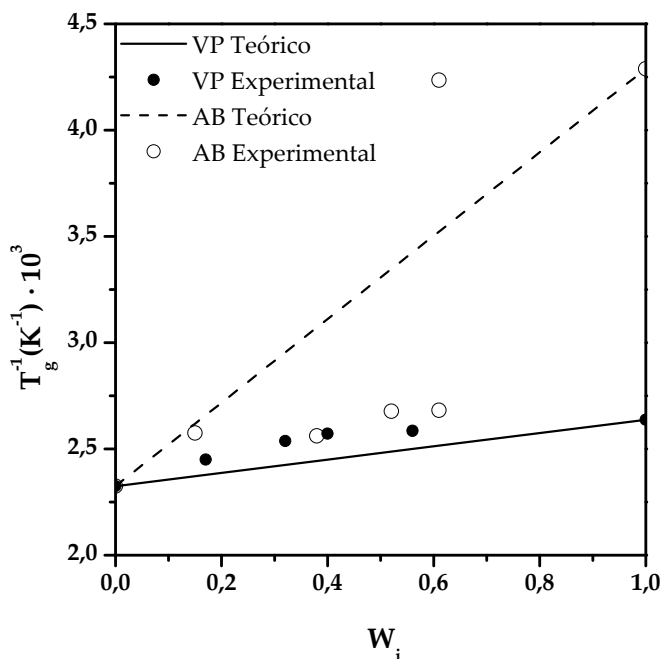


Figura III.16. T_g experimentales (círculos) y representación de la ecuación de Fox (líneas) para los sistemas basados en AMPS. Círculo relleno y línea continua: poli(VP-co-AMPS); Círculo hueco y línea discontinua: poli(AB-co-AMPS).

- *Sistema poli(AB-co-AMPS):* En la Tabla III. 11 se muestran los valores de la T_g de los diferentes copolímeros.

Poli(AB-co-AMPS)	(25:75)	(50:50)	(65:35)	(75:25)
T_g (°C)	115,3	117,3	100,4	-37,4; 99,8

Tabla III.11. Temperatura de transición vítrea de los copolímeros Poli(AB-co-AMPS).

En este caso, los valores experimentales no se ajustan a la ecuación de Fox (Ecuación III.1), incluso la composición (75:25) presentó dos T_g diferentes (Figura III.16). Esto nos indica que los copolímeros forman

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

segmentos muy ricos en cada uno de los comonómeros. De esta forma, la T_g de $-37,4\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde a la temperatura de transición vítrea de segmentos ricos en AB mientras que la T_g de $99,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ corresponde a segmentos ricos en AMPS formados en el curso de la reacción de polimerización. El hecho de que sólo se detecten dos T_g en un copolímero puede deberse a que la intensidad de la transición de los segmentos ricos en AMPS impide la detección de la T_g de los segmentos ricos en AB.

- *Sistemas basados en el MANSA*: El análisis calorimétrico de los copolímeros basados en MANSA no muestra la T_g de estas macromoléculas. Esto puede deberse a que la baja concentración de MANSA que incorporan los copolímeros solo permite apreciar las transiciones de los homopolímeros de AB y VP.

Las **medidas termogravimétricas** nos permiten estudiar la degradación térmica de las macromoléculas.

El mecanismo de degradación térmica de compuestos acrílicos y metacrílicos, como el Poli(AB) y la Poli(VP), es predominantemente por fragmentación térmica de enlaces C-C de la propia cadena polimérica³²⁻³³. Por otro lado, el PAMPS degrada mediante reacciones secundarias de sus grupos laterales. El mecanismo de degradación del PAMPS ha sido estudiado en profundidad por Aggour³⁴⁻³⁵ y se puede describir mediante tres etapas consecutivas:

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

181 °C: Corresponde al desprendimiento de amoníaco y/o moléculas pequeñas, tras la reacción de imidación entre dos grupos amida adyacentes (Figura III.17).

218 °C: Se debe a la degradación de los grupos sulfónicos.

278 °C: Descomposición del esqueleto polimérico y de las imidas formadas durante la primera etapa de degradación.

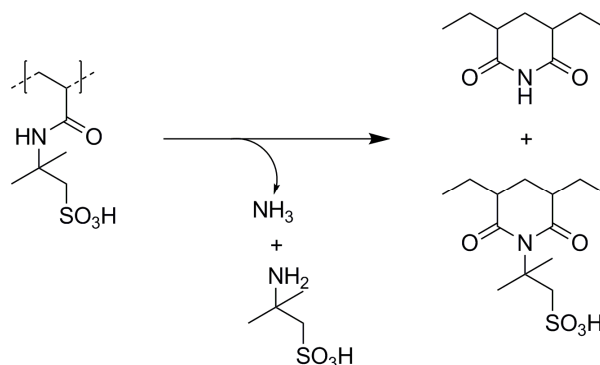


Figura III.17. Esquema de la reacción de imidación entre dos grupos amida adyacentes en el PAMPS

En la Figura III.18 se muestran los termogramas correspondientes al sistema poli(AB-*co*-AMPS).

Estos copolímeros no presentan la degradación térmica correspondiente a la etapa de ciclación (140–210 °C), lo que nos da indicios de que se produce la formación de polímeros al azar sin formación de cadenas ricas en AMPS. Las cadenas de poli(AB) descomponen por fragmentación térmica de la cadena principal en una sola etapa formando oligómeros entre 300–450 °C de temperatura y con un máximo de descomposición a 410 °C. En el sistema poli(AB-*co*-AMPS) se observan dos

etapas de pérdida de peso: Una primera 250–360 °C correspondiente a la descomposición térmica de cadenas de copolímero al azar; y una segunda etapa termodegradativa entre 350–450 °C que indica la descomposición de cadenas poliméricas ricas en AB.

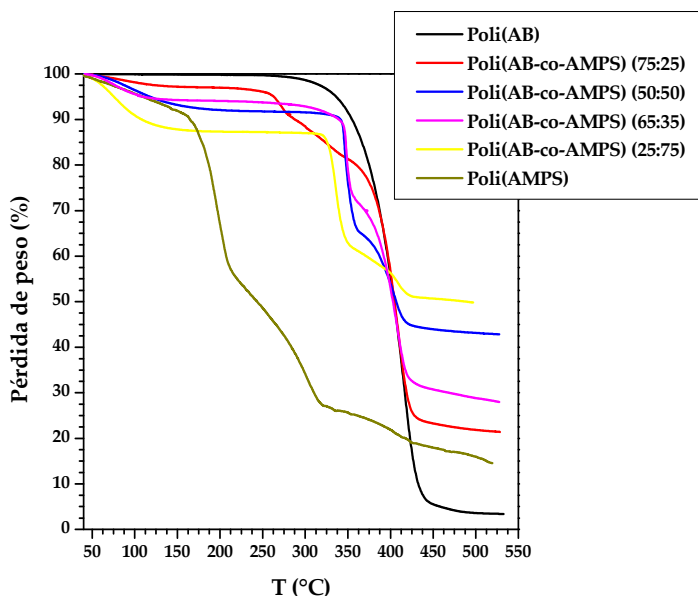


Figura III.18. Termogramas obtenidos por TGA para los sistemas poli(AB-co-AMPS).

En el caso de la poli(VP) (Figura III. 19) se produce una única etapa de degradación entre 350–470 °C con una temperatura de descomposición máxima a 440 °C. Las cadenas de poli(VP) se descomponen por la acción de la temperatura en escisiones aleatorias de la cadena principal, dando lugar a hidrocarburos de bajo peso molecular.

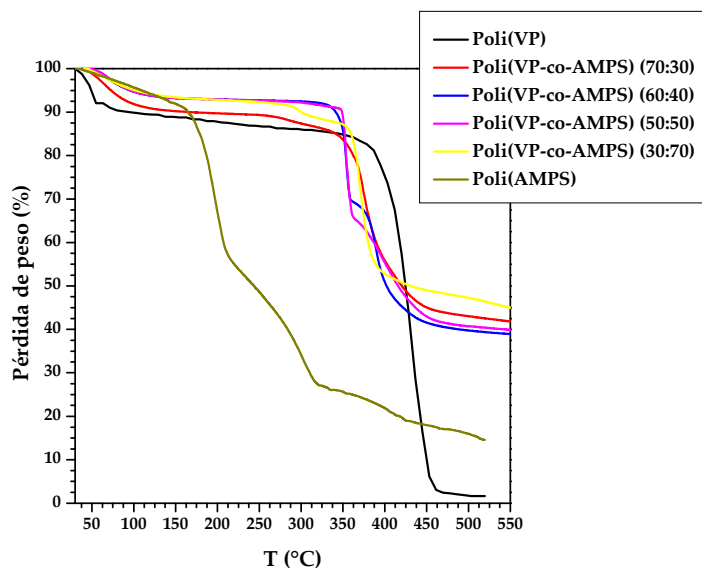


Figura III.19. Termogramas obtenidos por TGA para los sistemas poli(VP-co-AMPS).

La estabilidad térmica de los copolímeros poli(VP-co-AMPS) es mayor que la del poli(AMPS) estando la temperatura de degradación situada entre los dos homopolímeros. La degradación de este sistema tiene lugar en varias etapas: primero se da una pérdida de masa gradual entre 50 y 150 °C, que corresponde con el agua absorbida por la muestra; seguida de una zona estable que se extiende hasta 270-350 °C dependiendo de la composición. Al seguir aumentando la temperatura se da un proceso de descomposición en dos pasos, que corresponde con la degradación de macromoléculas ricas en secuencias alternantes y la degradación de secuencias ricas en AMPS o VP, dependiendo ésta de la composición inicial del sistema ya que, como se analizará en el siguiente apartado, éste es un sistema azeotrópico cuyos copolímeros poseen dis-

tinta microestructura en función de la concentración de monómeros en la alimentación; así se observa una degradación alrededor de los 425 °C para el poli(VP-co-AMPS) (70:30) (por encima del azeótropo) correspondiente a cadenas ricas en VP y otra degradación alrededor de 300 °C para el poli(VP-co-AMPS) (30:70) (por debajo del azeótropo) correspondiente a las cadenas ricas en AMPS.

En las Figura III. 20 y III. 21 se observan las degradaciones térmicas de los sistemas derivados del MANSA.

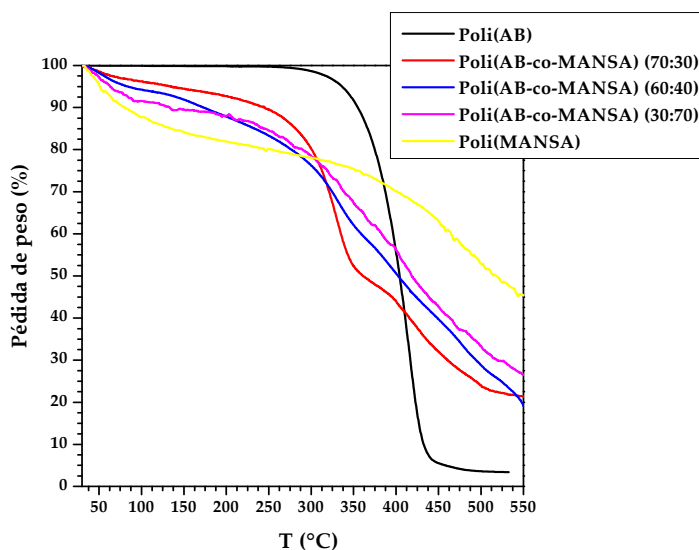


Figura III.20. Termogramas obtenidos por TGA para los sistemas poli(AB-co-MANSA).

La degradación del poli(MANSA) manifiesta una sola pérdida de peso que comienza a partir de 300 °C debido a la despolimerización radical de las cadenas macromoleculares.

III. Síntesis y caracterización de polímeros portadores de grupos sulfónicos

En el caso de los copolímeros poli(AB-co-MANSA), en primer lugar se da una pérdida de masa debida al agua absorbida por los copolímeros (50-150 °C) seguida de un *plateau* hasta los 200-250 °C dependiendo de la composición. Posteriormente se da una degradación típica de polímeros acrílicos que dan lugar a residuos carbónicos y sales de sulfato sódico que son estables a más de 550 °C en atmosfera de N₂.

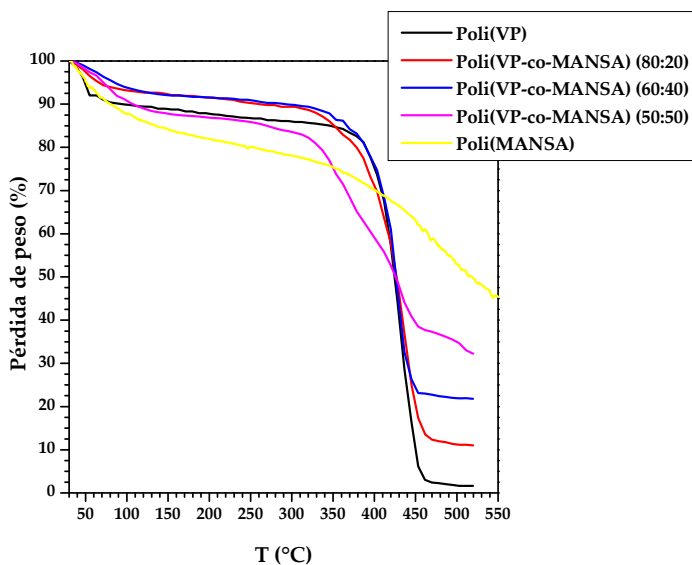


Figura III. 21. - Termogramas obtenidos por TGA para los sistemas poli(VP-co-MANSA).

En los copolímeros poli(VP-co-MANSA) se vuelve a observar la pérdida de peso debida al agua (50-150 °C) seguida de un *plateau* hasta los 250-325 °C dependiendo de la composición. La degradación de los sistemas poli(VP-co-MANSA) (80:20) y (60:40) se da en una sola etapa entre 360-450 °C, similar a la poli(VP), lo que indica la presencia de cadenas ricas en VP. El sistema poli(VP-co-MANSA) (50:50) presenta una

degradación intermedia entre los dos homopolímeros debido a que la presencia de MANSA es mayor.

III.3 Bibliografía

- (1) Xu, L.; Zhai, M.; Huang, L.; Peng, J.; Li, J., and Wei, G. Specific stimuli-responsive antipolyelectrolyte swelling of amphiphilic gel based on methacryloxyethyl dimethyloctane ammonium bromide. *Journal of Polymer Science, Part A: Polymer Chemistry*. **2008**, 46 (2), 473-480.
- (2) Eropkin, M. I.; Solovskii, M. V.; Tikhomirova, O. M.; Briazzhikova, T. S.; Smirnova, M. I.; Eropkina, E. M., and Smirnova, T. S. Synthesis and biological activity of complexes of sulfonate-containing polyanions and gentamycin. *Eksperimental'naia i klinicheskaia farmakologiya*. **2009**, 72 (5), 38-42.
- (3) Kaşgöz, H., and Durmus, A. Dye removal by a novel hydrogel-clay nanocomposite with enhanced swelling properties. *Polymers for Advanced Technologies*. **2008**, 19 (7), 838-845.
- (4) Solovskii, M. V.; Eropkin, M. Y.; Eropkina, E. M.; Slita, A. V.; Smirnova, M. Y.; Vlasova, E. N.; Tarabukina, E. B., and Amirova, A. I. Synthesis and properties of low-molecular-weight copolymers of acrylamide with 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid, as potential drug carriers. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2007**, 80 (10), 1703-1707.
- (5) Zhou, M., and Zhao, J. Z. Preparation of P(AM-co-AMPS) hydrogel microparticles by inverse suspension polymerization. *Xiandai Huagong/Modern Chemical Industry*. **2009**, 29 (12), 46-48.
- (6) Kabiri, K.; Mirzadeh, H., and Zohuriaan-Mehr, M. J. Chitosan modified MMT-Poly(AMPS) nanocomposite hydrogel: Heating effect on swelling and rheological behavior. *Journal of Applied Polymer Science*. **2010**, 116 (5), 2548-2556.
- (7) Niu, L. D.; Fu, X. K.; Liu, S. J., and Du, Q. L. Polymer electrolytes based on PAMPSLi/P(MMA-VAc). *Gaodeng Xuexiao Huaxue Xuebao/Chemical Journal of Chinese Universities*. **2010**, 31 (2), 391-396.

- (8) Liekens, S.; Leali, D.; Neyts, J.; Esnouf, R.; Rusnati, M.; Dell'era, P.; Maudgal, P. C.; De Clercq, E., and Presta, M. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds. *Molecular Pharmacology*. **1999**, 56 (1), 204-213.
- (9) Liekens, S.; Neyts, J.; Dégrève, B., and De Clercq, E. The sulfonic acid polymers PAMPS [Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesulfonic acid)] and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology Research*. **1997**, 9 (4), 173-181.
- (10) Quesada, A. R.; Oz, C., and Medina, M. A. Anti-angiogenic drugs: From bench to clinical trials. *Medicinal Research Reviews*. **2006**, 26 (4), 483-530.
- (11) Smith, G.; Wermuth, U. D.; Young, D. J., and White, J. M. Zwitterionic 5-amino-2-naphthalenesulfonic acid. *Acta Crystallographica Section E: Structure Reports Online*. **2004**, 60 (11).
- (12) Wei, X. L.; Wang, Y. Z.; Long, S. M.; Bobeczko, C., and Epstein, A. J. Synthesis and physical properties of highly sulfonated polyaniline. *Journal of the American Chemical Society*. **1996**, 118 (11), 2545-2555.
- (13) Wei, Z., and Wan, M. Synthesis and characterization of self-doped poly(aniline-co-aminonaphthalene sulfonic acid) nanotubes. *Journal of applied polymer science*. **2003**, 87 (8), 1297-1301.
- (14) Fernández-Tornero, C.; Lozano, R. M.; Redondo-Horcajo, M.; Gómez, A. M.; López, J. C.; Quesada, E.; Uriel, C.; Valverde, S.; Cuevas, P.; Romero, A., and Giménez-Gallego, G. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *The Journal of biological chemistry*. **2003**, 278 (24), 21774-21781.
- (15) Gimeno, M. J.; García-Esteo, F.; García-Honduvilla, N.; San Román, J.; Bellón, J. M., and Buján, J. A novel controlled drug-delivery system for growth hormone applied to healing skin wounds in diabetic rats. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*. **2003**, 14 (8), 821-835.

- (16) Carr, D. A., and Peppas, N. A. Assessment of poly(methacrylic acid-co-N-vinyl pyrrolidone) as a carrier for the oral delivery of therapeutic proteins using Caco-2 and HT29-MTX cell lines. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. **2010**, 92 (2), 504-512.
- (17) Gaucher, G.; Asahina, K.; Wang, J., and Leroux, J. C. Effect of poly(V-vinyl-pyrrolidone)-block-poly(D,L-lactide) as coating agent on the opsonization, phagocytosis, and pharmacokinetics of biodegradable nanoparticles. *Biomacromolecules*. **2009**, 10 (2), 408-416.
- (18) Moshaverinia, A.; Ansari, S.; Movasaghi, Z.; Billington, R. W.; Darr, J. A., and Rehman, I. U. Modification of conventional glass-ionomer cements with N-vinylpyrrolidone containing polyacids, nano-hydroxy and fluoroapatite to improve mechanical properties. *Dental Materials*. **2008**, 24 (10), 1381-1390.
- (19) Rodríguez-Lorenzo, L. M.; García-Carrodegua, R.; Rodríguez, M. A.; De Aza, S.; Jiménez, J.; López-Bravo, A.; Fernandez, M., and San Román, J. Synthesis, characterization, bioactivity and biocompatibility of nanostructured materials based on the wollastonite-poly(ethylmethacrylate-co-vinylpyrrolidone) system. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*. **2009**, 88 (1), 53-64.
- (20) Prasitsilp, M.; Siri Wittayakorn, T.; Molloy, R.; Suebsanit, N.; Siri Wittayakorn, P., and Veeranondha, S. Cytotoxicity study of homopolymers and copolymers of 2-hydroxyethyl methacrylate and some alkyl acrylates for potential use as temporary skin substitutes. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. **2003**, 14 (7), 595-600.
- (21) Rickert, D.; Lendlein, A.; Schmidt, A. M.; Kelch, S.; Roehlke, W.; Fuhrmann, R., and Franke, R. P. In Vitro Cytotoxicity Testing of AB-Polymer Networks Based on Oligo(ϵ -caprolactone) Segments after Different Sterilization Techniques. *Journal of Biomedical Materials Research - Part B Applied Biomaterials*. **2003**, 67 (2), 722-731.
- (22) Richard, R. E.; Schwarz, M.; Ranade, S.; Chan, A. K.; Matyjaszewski, K., and Sumerlin, B. Evaluation of acrylate-based block copolymers prepared by atom transfer radical

- polymerization as matrices for paclitaxel delivery from coronary stents. *Biomacromolecules*. **2005**, 6 (6), 3410-3418.
- (23) Duvigneau, J.; Schönherr, H., and Vancso, G. J. Atomic force microscopy based thermal lithography of poly(tert-butyl acrylate) block copolymer films for bioconjugation. *Langmuir*. **2008**, 24 (19), 10825-10832.
- (24) Wen, W.; Wan, J.; Cao, X., and Xia, J. Preparation of a light-sensitive and reversible dissolution copolymer and its application in lysozyme purification. *Biotechnology Progress*. **2007**, 23 (5), 1124-1129.
- (25) Garay-Jimenez, J. C.; Gergeres, D.; Young, A.; Lim, D. V., and Turos, E. Physical properties and biological activity of poly(butyl acrylate-styrene) nanoparticle emulsions prepared with conventional and polymerizable surfactants. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine*. **2009**, 5 (4), 443-451.
- (26) Tokumura, F.; Matsui, T.; Suzuki, Y.; Sado, M.; Taniguchi, M.; Kobayashi, I.; Kamiyama, M.; Suda, S.; Nakamura, A.; Yamazaki, Y.; Yamori, A.; Igarashi, R.; Kawai, J., and Oka, K. The potential dermal irritating effect of residual (meth)acrylic monomers in pressure sensitive adhesive tapes. *Drug and Chemical Toxicology*. **2010**, 33 (1), 1-7.
- (27) Pasch, H. Hyphenated techniques in liquid chromatography of polymers. *Advances in Polymer Science*. **2000**, 150 1-66.
- (28) Moad, G.; Chong, Y. K.; Skidmore, M. A.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. (2008) *Advances in raft polymerization: Improved nanostructured materials*, 1 ed., pp 293-294, American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry, New Orleans, LA.
- (29) Moad, G.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. Toward living radical polymerization. *Accounts of chemical research*. **2008**, 41 (9), 1133-1142.
- (30) Moad, G.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process A second update. *Australian Journal of Chemistry*. **2009**, 62 (11), 1402-1472.
- (31) Alencar de Queiroz, A. A.; Gallardo, A., and San Román, J. Vinylpyrrolidone-N,N'-dimethylacrylamide water-soluble

- copolymers: synthesis, physical-chemical properties and proteic interactions. *Biomaterials*. **2000**, 21 1631-1643.
- (32) Grassie, N., and Jenkins, R. H. Photothermal degradation of copolymers of methyl methacrylate and n-butyl acrylate. *European Polymer Journal*. **1973**, 9 (8), 697-716.
- (33) Peniche, C.; Zaldivar, D.; Pazos, M.; Paz, S.; Bulay, A., and San Roman, J. Study of the thermal degradation of poly (N-vinyl-2-pyrrolidone) by thermogravimetry-FTIR. *Journal of Applied Polymer Science*. **1993**, 50 (3), 485-493.
- (34) Aggour, Y. A. Synthesis and characterization of copolymers of 2-(dimethylamino)ethyl acrylate with 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonic acid. *Polymer Degradation and Stability*. **1994**, 45 (3), 273-276.
- (35) Aggour, Y. A. Thermal degradation of copolymers of 2-acrylamido-2-methylpropanesulphonic acid with acrylamide. *Polymer Degradation and Stability*. **1994**, 44 (1), 71-73.

IV. Caracterización microestructural

IV.1 Introducción

Las propiedades fisicoquímicas y el comportamiento biológico de los sistemas poliméricos dependen, principalmente, de las características químicas y de la distribución de los diferentes componentes a lo largo de las cadenas sintetizadas durante el proceso de polimerización¹. A partir de estas características se puede predecir directa o indirectamente el comportamiento del polímero en diferentes situaciones.

En el caso de copolimerizaciones radicales, la distribución de monómeros en la cadena polimérica se puede determinar fácilmente mediante el cálculo de las relaciones de reactividad de la reacción, ya que la mayoría de las reacciones de copolimerización siguen un perfil cinético que se ajusta al modelo terminal descrito por Mayo y Lewis en 1944² y la variación de la concentración con el tiempo se puede calcular se puede calcular mediante medidas de UV, IR, RMN...³⁻⁵ El cálculo de las relaciones de reactividad nos va a proporcionar información clara acerca de la composición media y de la distribución estadística de secuencias de monómeros (microestructura) en el sistema copolimérico⁶.

Las características microestructurales que adquiere el polímero durante el proceso de polimerización tienen una gran influencia en las interacciones intermoleculares entre las diferentes cadenas macromoleculares. Además, la incorporación de cadenas de carácter hidrofóbico o la presencia de cargas eléctricas pueden determinar la organización y el autoensamblado de las cadenas poliméricas permitiendo la formación de estructuras supramoleculares tipo micelas, coloides o nanopartícu-

las⁷. Uno de los puntos más estudiados en el campo del auto-ensamblado de copolímeros es la formación de micelas en medio acuoso a partir de copolímeros de bloque con carácter anfifílico⁸⁻¹⁰, formando estructuras organizadas como se observa en la Figura IV.1.

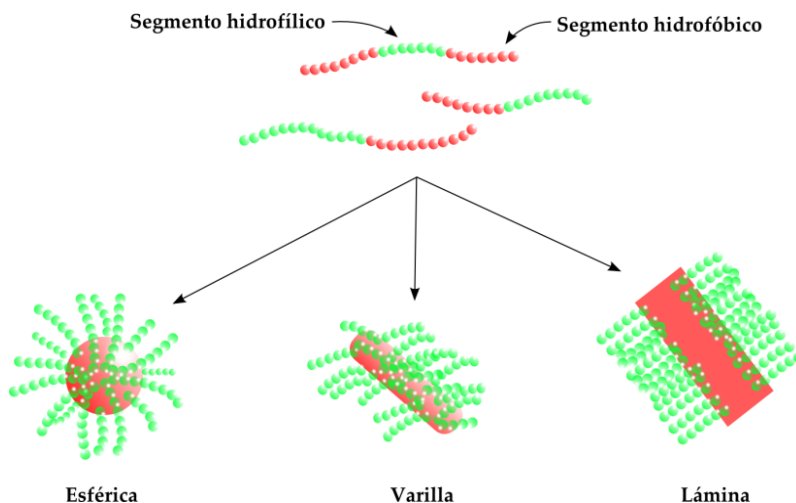


Figura IV.1. Algunas de las posibles morfologías que pueden adoptar los copolímeros de bloque anfifílicos en disolución acuosa.

En este capítulo se describe la caracterización microestructural de las macromoléculas. En primer lugar se determinarán los valores de las relaciones de reactividad mediante ^1H -RMN *in situ* para determinar la organización microestructural de las cadenas poliméricas. En segundo lugar se determinará la formación de partículas en suspensión en medio acuoso mediante medidas de dispersión de luz dinámica y potencial zeta.

IV.1.1 Copolimerización radical. Relaciones de reactividad.

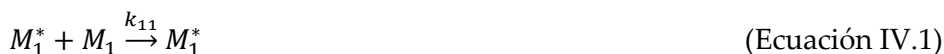
Los procesos de copolimerización nos permiten la síntesis de un amplio abanico de copolímeros mediante el uso de comonómeros de distintas naturalezas. Con lo cual podemos lograr obtener productos con propiedades específicas para determinadas aplicaciones.

El proceso de copolimerización transcurre en tres etapas: iniciación, propagación y terminación¹¹; donde la etapa de propagación es la que determina la composición del copolímero como consecuencia de la distinta reactividad de los monómeros al adicionarse a la cadena polimérica.

Modelo terminal de copolimerización

El modelo terminal de copolimerización propuesto por Mayo y Lewis², asume que la reactividad de la especie en propagación depende únicamente de la unidad final que porta el centro activo y no de la composición de la cadena que le precede.

Considerando el caso de dos monómeros M_1 y M_2 , los dos tipos de especies en propagación serán M_1^* y M_2^* . Las reacciones de propagación posibles serán:



donde k_{11} , k_{12} , k_{21} y k_{22} son las constantes cinéticas de cada una de las reacciones de propagación. Se asume que el estado estacionario se alcanza rápidamente y la concentración de radicales permanece constante durante toda la reacción. Esto supone que la velocidad a la que los radicales M_1^* se convierten en M_2^* es igual que la velocidad a la que M_2^* se convierte en M_1^* , de tal forma, que el número de radicales que se forman es igual al número de radicales que se consumen. Por lo tanto, las velocidades de reacción de las ecuaciones (Ecuación IV.2 y IV.3) son iguales:

$$k_{21} \cdot [M_2^*] \cdot [M_1] = k_{12} \cdot [M_1^*] \cdot [M_2] \quad (\text{Ecuación IV.5})$$

Las velocidades de desaparición de los monómeros (despreciando el monómero consumido en la iniciación) serán:

$$-d[M_1]/dt = k_{11} \cdot [M_1^*] \cdot [M_1] + k_{21} \cdot [M_2^*] \cdot [M_1] \quad (\text{Ecuación IV.6})$$

$$-d[M_2]/dt = k_{12} \cdot [M_1^*] \cdot [M_2] + k_{22} \cdot [M_2^*] \cdot [M_2] \quad (\text{Ecuación IV.7})$$

Si dividimos ambas ecuaciones y definimos las relaciones de reactividad de los monómeros como: $r_1 = k_{11}/k_{12}$ y $r_2 = k_{22}/k_{21}$ (r_i expresa la reactividad relativa de cada tipo de radical con su propio monómero respecto del otro monómero) tenemos:

$$\frac{d[M_1]}{d[M_2]} = \frac{[M_1]}{[M_2]} \cdot \frac{r_1 \cdot [M_1] + [M_2]}{[M_1] + r_2 \cdot [M_2]} \quad (\text{Ecuación IV.8})$$

Ésta es la ecuación de composición del copolímero o ecuación de copolimerización, que expresa la composición instantánea del copolímero en función de las relaciones de reactividad y de la concentración de los monómeros en la alimentación. La ecuación de copolimeri-

zación puede expresarse también en función de las fracciones molares, ya que la relación $d[M_1]/d[M_2]$ es la relación F_1/F_2 o fracción molar instantánea en el copolímero. Si se considera que f_1 y f_2 son las fracciones molares de las unidades monoméricas, podemos llegar a la siguiente ecuación:

$$\frac{F_1}{F_2} = \frac{f_1 \cdot (r_1 \cdot f_1 + f_2)}{f_2 \cdot (r_2 \cdot f_2 + f_1)} \quad (\text{Ecuación IV.9})$$

Ecuación diferencial de composición

La estimación de las relaciones de reactividad se realiza habitualmente a partir de la ecuación diferencial de composición (Ecuaciones IV.8 y IV.9). Para obtener los valores de las relaciones de reactividad hay que tener en cuenta el carácter diferencial de las ecuaciones, por lo que será necesario preparar copolímeros a baja conversión y determinar su composición mediante análisis elemental, técnicas isotópicas o espectroscópicas (UV,IR,RMN).

El ajuste de los datos experimentales a la ecuación diferencial de composición se suele realizar a partir de parejas de valores f_1/F_1 calculados experimentalmente utilizando procedimientos de linealización como son los métodos de Fineman-Ross¹² y Kelen-Tüdös¹³ o mediante el ajuste no lineal de los resultados, como son los algoritmos de Tidwell y Mortimer¹⁴. Estos métodos nos dan valores aproximados de las relaciones de reactividad, siendo los algoritmos no lineales propuestos por Behnken¹⁵ la aproximación más correcta a la hora de estimar dichos parámetros.

Ecuación integrada

Los métodos estándar utilizados para la estimación de r_1 y r_2 , que emplean la ecuación diferencial de copolimerización, implican la preparación, aislamiento y purificación de copolímeros a baja conversión en todo el intervalo de composiciones molares. Este protocolo es tedioso y arrastra un gran número de errores experimentales y problemas intrínsecos ineludibles (pérdida de material, la reacción no se detiene instantáneamente, presencia de monómero residual o disolventes y fraccionamiento de la muestra). Además, el copolímero obtenido no corresponde al formado instantáneamente con la composición inicial en alimentación, sino que se trata del promedio de copolímeros formados hasta que la copolimerización se para a baja conversión. Aún así, esta aproximación está ampliamente aceptada debido a que proporciona una buena aproximación.

Otra forma de determinar las relaciones de reactividad es utilizar la forma integrada de la ecuación diferencial de composición. La utilización de la ecuación integrada no conlleva esta limitación y puede ser utilizada para altas conversiones, ya que tienen en cuenta la variación de composición¹⁶⁻¹⁷.

$$\frac{[M_2]}{[M_{20}]} = \left[\frac{[M_{20}] \cdot [M_1]}{[M_{10}] \cdot [M_2]} \right]^{\frac{r_2}{1-r_2}} \cdot \left[\frac{(r_1 - 1) \cdot ([M_1]/M_2) - r_2 + 1}{(r_1 - 1) \cdot ([M_{10}]/M_{20}) - r_2 - 1} \right]^{\frac{r_1 \cdot r_2 - 1}{(1-r_1) \cdot (1-r_2)}}$$

(Ecuación IV.10)

La estimación de las relaciones de reactividad se puede realizar mediante métodos lineales o no lineales, como los propuestos por Mao y Huglin¹⁸⁻¹⁹, pero ambos requieren de técnicas que permitan el cálculo de la composición del copolímero durante la reacción.

La composición del copolímero puede determinarse de dos formas: indirectamente, midiendo la concentración de los monómeros que no han reaccionado y haciendo balances de materia para calcular la fracción molar de monómeros en el copolímero acumulado; o bien directamente, midiendo la composición del copolímero formado. En cualquiera de los dos casos es necesaria la separación de monómeros y copolímero, ya que ambos poseen prácticamente los mismos grupos funcionales.

En el presente trabajo, las relaciones de reactividad se calcularon siguiendo una metodología simple y novedosa, desarrollada por nuestro grupo de investigación²⁰. Para ello se utilizó la solución integrada exacta de la ecuación diferencial de copolimerización definida para el modelo terminal para ajustar directamente la evolución de las concentraciones de monómeros obtenidas por análisis cuantitativo de ¹H-RMN. Si la reacción se ajusta al modelo terminal, un ajuste no lineal por mínimos cuadrados da los valores óptimos de las relaciones de reactividad. El proceso posee varias ventajas sobre el método estándar, ya que al tratarse de una monitorización *in situ*, no es necesaria la manipulación de la muestra, ni el aislamiento del copolímero, con lo que obte-

nemos datos instantáneos de composición en el copolímero a partir del consumo de monómero.

Siguiendo este método, se puede relacionar la variación de la concentración de monómeros con las relaciones de reactividad utilizando la ecuación integrada de copolimerización que describe el modelo terminal (Ecuación IV.10):

$$y = \left[\frac{x}{x_0} \right]^{\frac{r_2}{1-r_2}} \cdot \left[\frac{1-b+(a-1) \cdot x}{1-b+(a-1) \cdot x_0} \right]^{\frac{a \cdot b - 1}{(1-a) \cdot (1-b)}} \quad (\text{Ecuación IV.11})$$

Siendo $x = [M_1]/[M_2]$; $y = [M_2]$; $a = r_1$; $b = r_2$

A pesar de que la ecuación integrada de copolimerización está bien descrita en la literatura, el método más utilizado para analizar las composiciones en alimentación y copolímero en función de la conversión es el desarrollado por Skeist²¹, el cual utiliza composiciones promedio. En este caso, en cambio, se utilizarán datos de composición instantánea obtenidos mediante monitorización *in situ* de la ecuación de copolimerización.

Aplicando la ecuación IV.11 y tomando distintos valores de x_0 - y_0 , es decir, considerando distintos puntos experimentales x_t - y_t como puntos iniciales de la reacción del sistema objeto de estudio, ajustamos por mínimos cuadrados el conjunto de puntos experimentales a la ecuación IV.11, con lo que obtenemos distintos valores de r_1 y r_2 para cada uno de los ajustes. Los datos presentan una particular tendencia lineal, que al igual que en el modelo de Mayo-Lewis, posee pendiente positiva que aumenta al incrementar la relación $[M_1]/[M_2]$. El error

experimental asociado a cada x_0 , y_0 hace que los valores de r_1 y r_2 se desplacen a lo largo de una línea recta para cada serie de datos obtenida con cada una de las reacciones. Esto se debe a que las relaciones de reactividad, que se ajustan a cada grupo de puntos experimentales, están altamente relacionadas. Si se representan el conjunto de valores r_1 - r_2 obtenidos para las reacciones llevadas a cabo con las distintas composiciones de partida, se obtiene un punto de corte que va a corresponder con el valor de las relaciones de reactividad verdadero, independientemente del error introducido por x_0 , y_0 . Si la técnica experimental y el desarrollo teórico fueran completamente perfectos, las rectas de los tres experimentos poseerían un único punto de intersección común y no delimitarían una región de puntos. Es decir, a mejor diseño del experimento, menor es la región r_1 - r_2 óptima.

La gran diferencia entre este método y el descrito por Mayo-Lewis para polímeros sintetizados a alta conversión, es que ellos determinaban r_1 y r_2 mediante iteraciones con un solo dato de composición inicial y final. Sin embargo, mediante este método, r_1 y r_2 se obtienen de la monitorización de las reacciones de copolimerización y multitud de datos de composición. El método de Mayo-Lewis utiliza datos de composición puntuales y este método obtiene datos de composición instantánea en todo el rango de conversiones monitorizadas.

IV.1.2 Dispersión de luz dinámica

La dispersión de luz dinámica (DLS) básicamente consiste en medir la intensidad de las fluctuaciones de un haz de luz láser dispersado al hacerlo pasar por una disolución (Figura IV. 2).

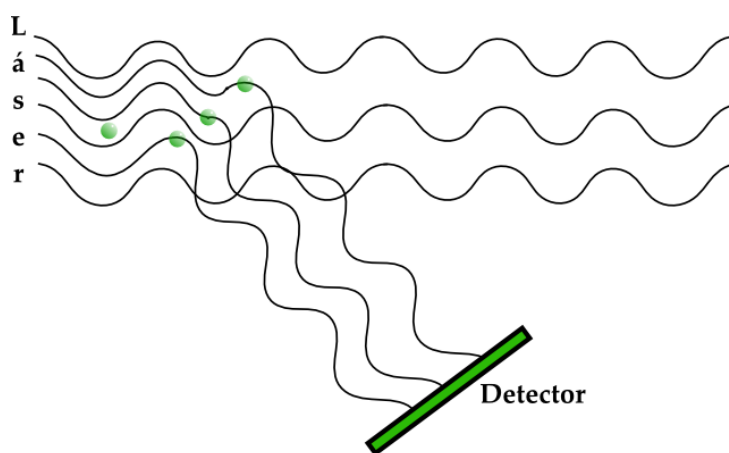


Figura IV. 2. - Las partículas en suspensión dispersan la luz de un láser y es registrado por un detector.

Aunque en la Figura IV. 2 las partículas se representan estáticas, éstas se van a encontrar en un continuo movimiento aleatorio denominado movimiento Browniano. Este movimiento aleatorio se debe a que las partículas en suspensión se encuentran colisionando continuamente con las moléculas de disolvente que las rodean. Además, estas colisiones afectan de forma distinta a las partículas según su tamaño, lo que hace que las partículas pequeñas se muevan más rápidamente que las grandes²². La relación entre el tamaño de partícula y su velocidad debida al efecto Browniano se puede calcular mediante la relación de Stokes-Einstein²³:

$$D = \frac{k_B \cdot T}{3 \cdot \pi \cdot \eta \cdot x_H} \quad (\text{Ecuación IV.12})$$

donde k_B es la constante de Boltzman, T la temperatura, η la viscosidad, x_H el radio hidrodinámico y D el coeficiente de difusión.

Este coeficiente de difusión se puede calcular a partir de los datos experimentales obtenidos de variaciones de fluctuación de las nanopartículas²⁴:

$$g^{(1)}(t) = \exp \left[- \left(\frac{4 \cdot \pi}{\lambda} \sin(\theta/2) \right)^2 \cdot D \cdot t \right] \quad (\text{Ecuación IV. 13})$$

donde λ es la longitud de onda del láser utilizado y θ el ángulo al cual se mide la dispersión.

Con esta ecuación, los datos experimentales se pueden ajustar a una ecuación exponencial (conocida como función de correlación, $g^{(1)}(t)$) para obtener el valor de la constante de difusión y por consiguiente el radio hidrodinámico de las partículas en suspensión.

IV.1.3 Potencial Zeta

El potencial zeta es el término científico que se utiliza para definir el potencial electrocinético de un sistema coloidal. Desde un punto de vista teórico se puede definir como el potencial eléctrico que se produce entre el medio y una capa de fluido estacionario (capa de Stern) que se forma alrededor de la partícula en suspensión debido a sus propiedades iónicas.

La importancia del potencial zeta es que su valor está relacionado con la estabilidad de la dispersión y la magnitud de carga eléctrica de la partícula en suspensión. Su valor indica el grado de repulsión entre partículas adyacentes. Un alto potencial zeta indica que las partículas en suspensión son fuertemente repelidas entre sí impidiendo su agregación y precipitación. Cuando el potencial es bajo, la atracción supera la repulsión y la dispersión precipitará.²⁵⁻²⁶

Modelo de la doble capa

Una partícula cargada en suspensión atraerá los contraiones del medio provocando una reorganización de sus cargas superficiales y de las cargas en equilibrio del medio. Este efecto fue estudiado por Hunter y se conoce como el modelo de la doble capa²⁵. Como se ilustra en la Figura IV.3, sobre la superficie de la partícula se sitúa una capa de contraiones inmovilizados de varios Angstroms de espesor y que se encuentra fuertemente atraída por la partícula. A esta capa se la denomina *capa compacta* o *capa de Stern*. Debido a las atracciones electrostáticas, la concentración de contraiones disminuye según vamos alejando de la partícula. La concentración de coiones, sin embargo, aumenta al alejarse de la partícula debido a las repulsiones eléctricas. De esta forma se crea una carga neta en la región cercana a la superficie que va disminuyendo conforme se aleja la partícula hasta anularse. Esta región se conoce como *capa difusa* y su espesor depende de la concentración iónica y propiedades eléctricas del líquido. El límite entre ambas capas se conoce como *plano de corte*²⁵.

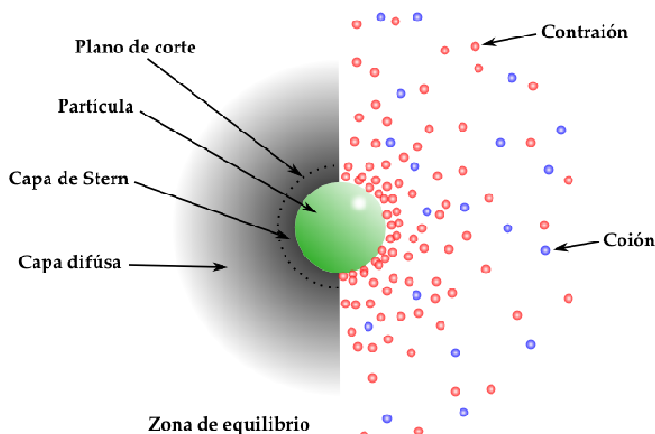


Figura IV.3. Modelo de la doble capa. En la izquierda se muestra el cambio en la densidad de carga (potencial eléctrico) alrededor del coloide. En la derecha se muestra la distribución de coiones y contraiones alrededor de la partícula.

El potencial eléctrico en la superficie de la partícula es un parámetro que resulta muy complicado de medir, sin embargo, el potencial eléctrico en el plano de corte se puede medir de forma sencilla y es conocido como potencial zeta (ζ)^{25, 27}.

El potencial zeta es también un indicador de la estabilidad de las micelas que se forman en disolución. Los estudios de Zhiwei Sun y colaboradores²⁸ llegaron a la conclusión de que partículas con potenciales zeta mayores a 20 mV en valor absoluto pueden considerarse estables en disolución. Este valor no se puede tomar como exacto debido a que existen numerosos factores que influyen en la estabilidad como pueden ser las repulsiones estéricas, pero es una aproximación bastante exacta para conocer la estabilidad de un determinado sistema.

Efecto electrocinético

Una consecuencia importante de la existencia de cargas eléctricas en la superficie de las partículas es que pueden interactuar con un campo eléctrico produciéndoles movimiento. A este fenómeno se le denomina efecto electrocinético y se puede dar de cuatro formas diferentes:

- ✓ Electroforesis: movimiento de la partícula cargada en relación con el líquido en el que se encuentra suspendido debido a la influencia del campo eléctrico aplicado. Es el método utilizado para la medida de potencial zeta.
- ✓ Electroósmosis: movimiento de un líquido en relación con una superficie inmóvil cargada bajo la influencia de un campo eléctrico.
- ✓ Potencial de flujo: generación de un campo eléctrico cuando se fuerza a un líquido a pasar a través de una superficie cargada.
- ✓ Potencial de sedimentación: generación de un campo eléctrico debido a la sedimentación de partículas cargadas.

Electroforesis

Si se aplica un campo eléctrico a través de un electrolito, las partículas cargadas que se encuentran en dicho electrolito son atraídas por los electrodos. La velocidad que adquiera una partícula en el fluido va a depender de: la intensidad del campo eléctrico, la constante dieléctrica del medio, la viscosidad del medio y del potencial zeta de la partí-

cula. A esta velocidad se le denomina movilidad electroforética y se puede calcular aplicando la ecuación de Henry²⁹⁻³⁰

$$U_E = \frac{2 \cdot \varepsilon \cdot z \cdot f(ka)}{3 \cdot \eta} \quad (\text{Ecuación IV.13})$$

donde U_E = Movilidad electroforética, z = Potencial zeta, ε = Constante dieléctrica, η = Viscosidad y $f(ka)$ = Función de Henry.

A partir de esta ecuación se puede calcular el potencial zeta mediante una simple medida de movilidad electroforética. Si se trabaja en disoluciones acuosas y con concentraciones de electrolito bajas se puede aplicar la aproximación de Smoluchowski²⁵ que asume que la función de Henry tiene un valor aproximado de 1,5, por lo que el potencial zeta se puede calcular como:

$$z = U_E \cdot \eta / \varepsilon \quad (\text{Ecuación IV.14})$$

IV.2 Materiales y métodos

IV.2.1 Reactivos

Los reactivos utilizados en el presente capítulo son los descritos en el capítulo anterior (véase pág. 40).

IV.2.2 Seguimiento de la copolimerización mediante ¹H-RMN *in situ*.

Las copolimerizaciones de los distintos productos se han llevado a cabo dentro de un equipo de RMN (Varian 400) utilizando DMSO deuterado (Sigma) como disolvente a 60±1 °C. La reacción se realizó

dentro del tubo de resonancia previa desoxigenación con nitrógeno y situando dentro un tubo capilar con diclorobenceno en DMSO que va a servir como señal de referencia (Figura IV.4). Se estudiaron distintas concentraciones de comonómeros con el fin de abarcar todo el intervalo de concentraciones, siendo la concentración total de monómeros de 0,25 M.

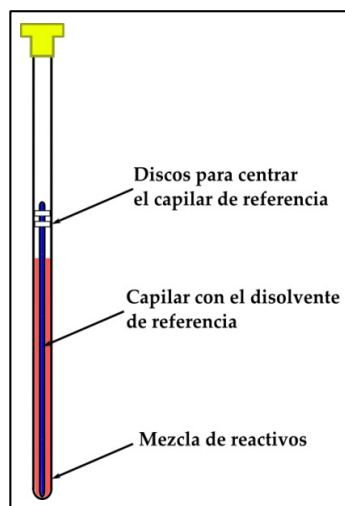


Figura IV.4. Disposición del tubo de RMN para medidas de cinéticas de copolimerización.

Para la obtención de los datos experimentales se utilizaron los siguientes parámetros en el equipo de resonancia:

- ☛ Secuencia de pulsos de 2,8 μ s, lo que equivale a un pulso de 90°.
- ☛ Adquisición de un espectro (punto experimental) cada 600 segundos: este tiempo resulta suficiente para permitir la total relajación de los protones vinílicos, cuyos tiempos de relajación no superan los 10 segundos²⁰.

✿ Velocidad de giro de 7 Hz.

Siguiendo esta metodología, se obtienen una serie de espectros que se han normalizado e integrado usando el programa wxNUTS (Versión 0.6.0) con el objetivo de obtener las concentraciones instantáneas en alimentación.

Con la intención de comprobar la exactitud del método, se sintetizaron muestras a baja conversión (tiempo de reacción corto) en las mismas condiciones que las mencionadas anteriormente pero en Dioxano/H₂O (80:20) y en una estufa termostatzada a 60 °C.

IV.2.3 Medidas de movilidad electroforética y tamaño de partícula.

Con el objetivo de estudiar la formación de estructuras micelares se han realizado medidas de tamaño de partícula y potencial zeta usando un equipo Zetasizer modelo Nano ZS (Malvern Instruments, UK) equipado con un láser rojo a 633 nm (He/Ne).

Las medidas de **tamaño de partícula** se realizaron utilizando la técnica de dispersión de luz dinámica. Para ello, se utilizaron disoluciones a 0,25 mg/ml de polímero en agua destilada que se introdujeron en la célula de medida cuidadosamente para evitar la formación de burbujas. Esta célula se introdujo en el Zetasizer y se dejó equilibrar a 37 °C durante 5 minutos antes de realizar las medidas de tamaño de partícula (cuatro réplicas). Este equipo utiliza un sistema de dispersión no invasivo (NIBS) donde la óptica no está en contacto con la muestra. El uso de este tipo de tecnología reduce los efectos debido a la multiplicidad

pudiéndose realizar medidas a mayores concentraciones y en el rango de los 0,6 nm-6 micras.

El **potencial zeta** se calculó a partir de medidas de movilidad electroforética. Para ello, el equipo aplica un campo eléctrico a la disolución y mide la velocidad a la que se mueven las partículas mediante velocimetría láser de efecto *Doppler*. Esta técnica consiste en medir la movilidad electroforética a partir del cambio de frecuencia o del cambio de fase de un haz de luz láser incidente debido al efecto *Doppler* causado por las partículas en movimiento (Figura IV.5).

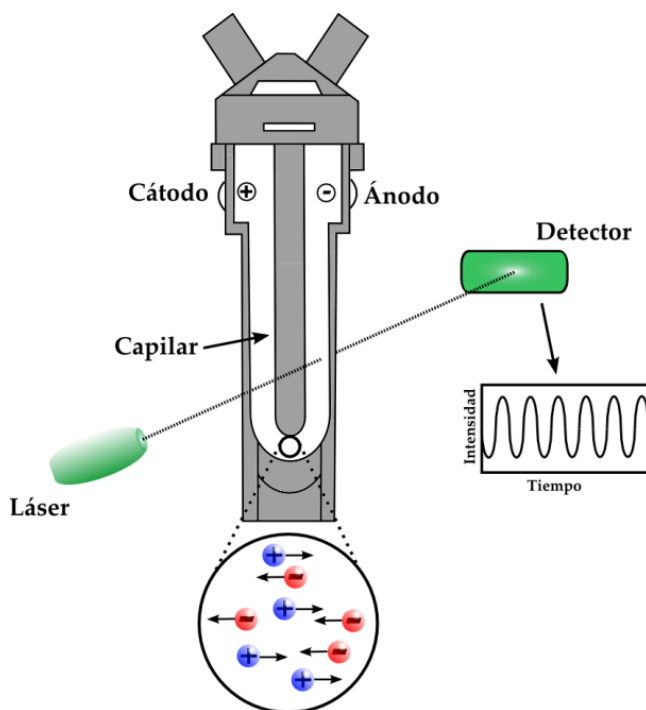


Figura IV.5. Cubeta para medidas de movilidad electroforética mediante LDV.

Para las medidas se utilizaron disoluciones de 0,25 mg/ml de polímero en 20 mM de NaCl. La célula se equilibró a 37 °C durante 5 minutos. Para las medidas de potencial zeta el equipo trabaja en automático realizando un mínimo de 10 conteos por medida. Cuando la diferencia de potencial zeta entre conteos es inferior a 0,5 mV en tres conteos consecutivos se toma el potencial zeta como definitivo. Con esta metodología se realizaron siete medidas por muestra con un intervalo entre medidas de 25 segundos.

IV.3 Resultados y discusión

IV.3.1 Cálculo de la relaciones de reactividad

Sistemas poliméricos basados en AMPS

Las reacciones de copolimerización fueron monitorizadas por ^1H -RMN. En las Figuras IV.6 y IV.7 se muestran los espectros de los sistemas poli(AB-*co*-AMPS) y poli(VP-*co*-AMPS) a distintos tiempos de reacción junto con la asignación de los protones empleados para la determinación de las concentraciones de los monómeros. También se observa la señal del diclorobenceno que se ha utilizado como referencia para el análisis cuantitativo.

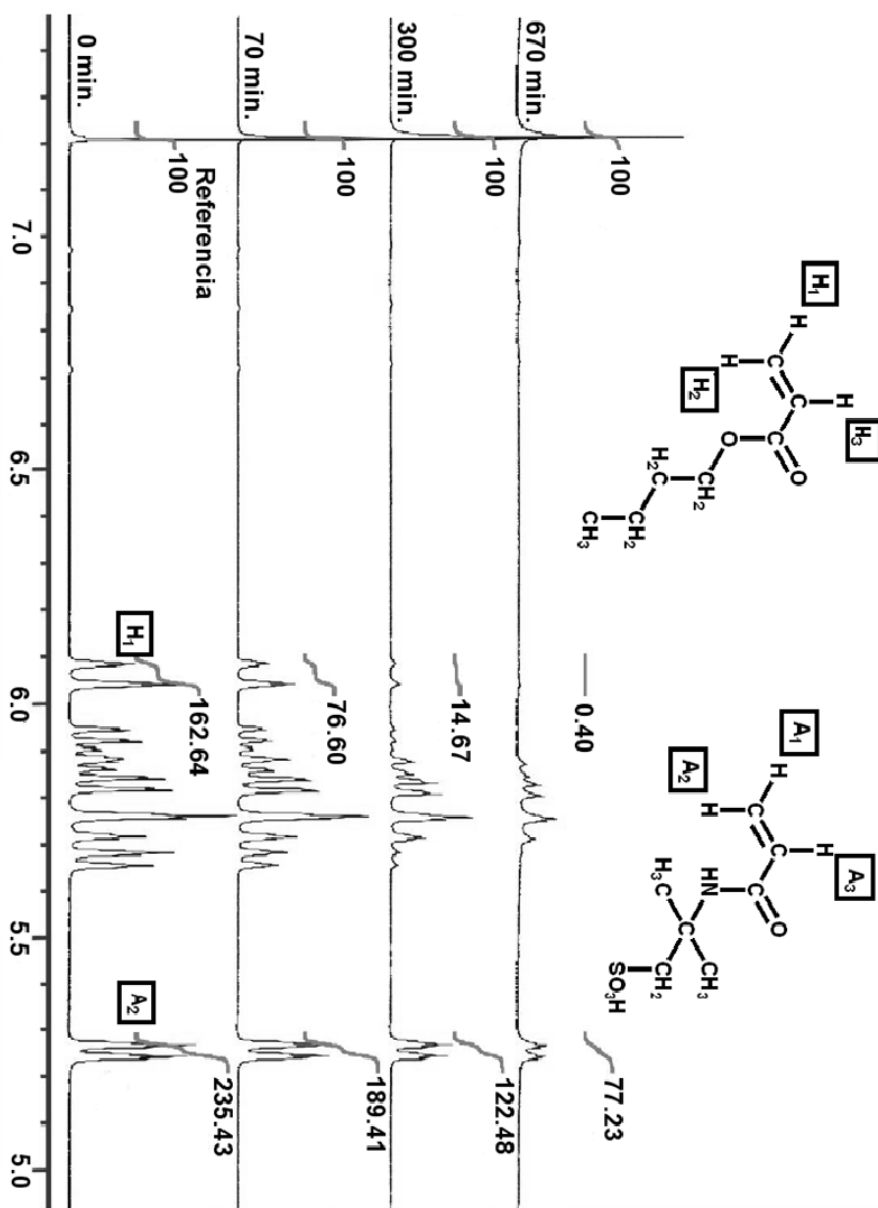


Figura IV.6. Detalle de la región acrílica de espectros representativos de la reacción de copolimerización entre AB y AMPS.

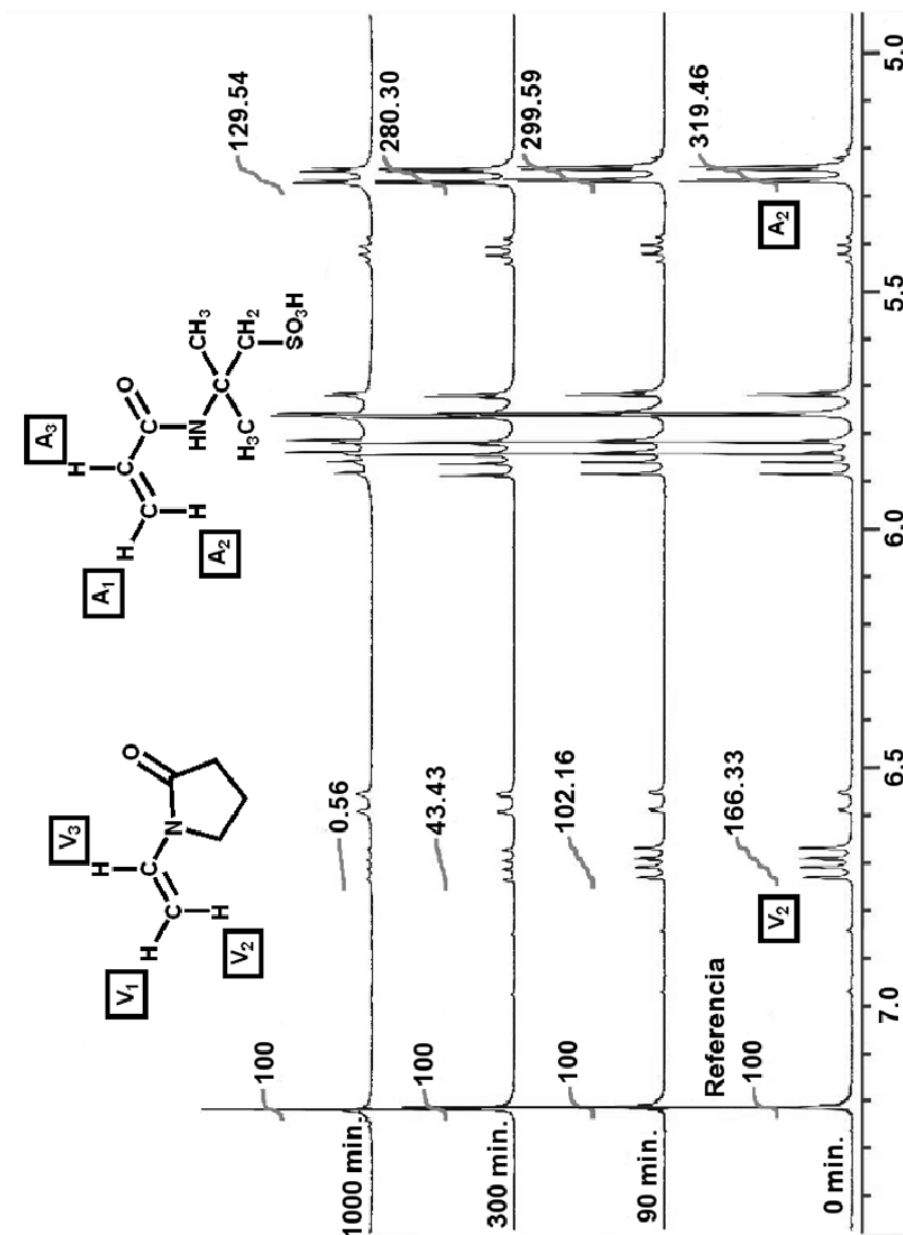


Figura IV.7. Detalle de la región acrílica de espectros representativos de la reacción de copolimerización entre VP y AMPS.

En la Figura IV.8 se muestra el diagrama de relaciones de reactividad correspondiente al sistema poli(AB-co-AMPS). Cada recta corresponde a los valores de las relaciones de reactividad calculados para cada una de las reacciones (fracciones molares iniciales de AMPS: 0,25 y 0,50) y tomando distintos valores iniciales x_0 , y_0 . La intersección de las dos rectas corresponde a los valores de r_1 y r_2 óptimos.

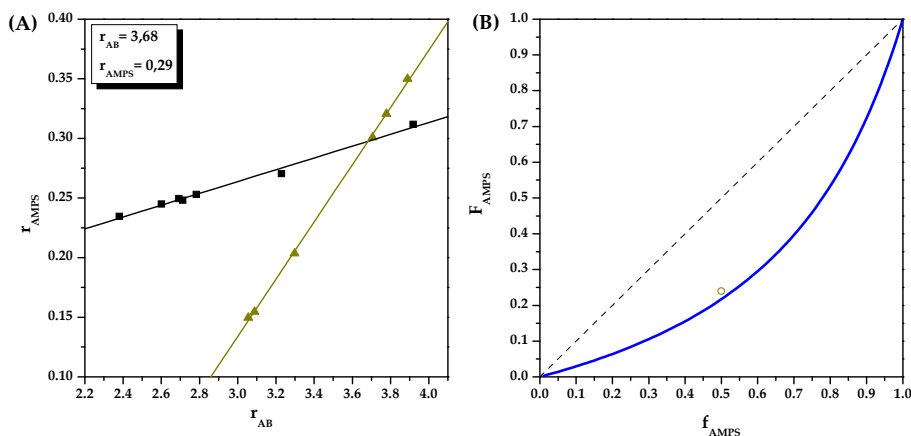


Figura IV.8. (A) Relaciones de reactividad para el sistema poli(AB-co-AMPS). (B) Diagrama de composición del sistema poli(AB-co-AMPS). f_{AMPS} : Fracción molar de AMPS en alimentación, F_{AMPS} : fracción molar de AMPS en el copolímero. El círculo corresponde al valor obtenido en una reacción a baja conversión en dioxano-agua (80:20).

Además, este sistema se aproxima a un comportamiento ideal ($r_{AB} \cdot r_{AMPS} = 1$), esto significa que la velocidad relativa de incorporación de los monómeros en los copolímeros es independiente de la estructura monomérica terminal de la cadena en propagación.

El AB es mucho más reactivo que el AMPS ($r_{AB} = 3,68$ y $r_{AMPS} = 0,29$). En la Figura IV.9 se muestra la predicción de la evolución en la concentración del copolímero en función de la conversión y la concentración en alimentación.

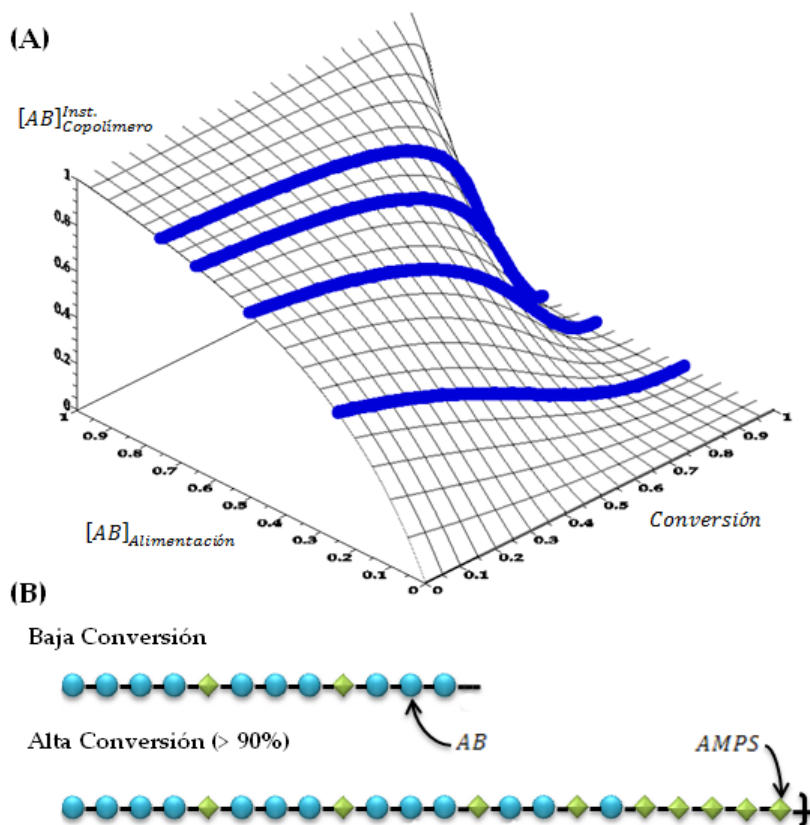


Figura IV.9. (A) Concentración instantánea de AB en los copolímeros poli(AB-co-AMPS) en función de la conversión y la concentración de AB en el alimento. Las líneas azules representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración en el alimento. ($f_{AB} = 0,25; 0,5; 0,65; 0,75$). (B) Representación esquemática de la microestructura de una reacción con una concentración inicial de AB de 0,5.

Este gráfico 3D se obtiene utilizando el algoritmo “Conversion” desarrollado en nuestro grupo en el 2004³¹. Dicho algoritmo predice teóricamente el curso de cualquier reacción de polimerización con la conversión a partir de unas relaciones de reactividad conocidas y con las consideraciones del modelo terminal de copolimerización.

De la Figura IV.9.A, se puede deducir que el sistema poli(AB-*co*-AMPS) evoluciona de la siguiente manera: Inicialmente se forman secuencias ricas en AB para posteriormente, a mayores conversiones, obtener cadenas con secuencias ricas en el monómero menos reactivo (AMPS).

El esquema de la Figura IV.9. B da una idea de la distribución microestructural de las secuencias monoméricas y de la heterogeneidad composicional de las macromoléculas sintetizadas a alta conversión; esto modula el balance hidrofílico/hidrofóbico del copolímero y, por lo tanto, su solubilidad y estabilidad en medio fisiológico.

En la Figura IV.10 se muestra el diagrama de relaciones de reactividad correspondiente al sistema poli(VP-*co*-AMPS). Cada recta corresponde a los valores de las relaciones de reactividad calculados para cada una de las reacciones (fracciones molares iniciales de AMPS: 0,25, 0,50 y 0,75) y tomando distintos valores iniciales x_0 , y_0 . La intersección de las tres rectas corresponde a los valores de r_1 y r_2 óptimos.

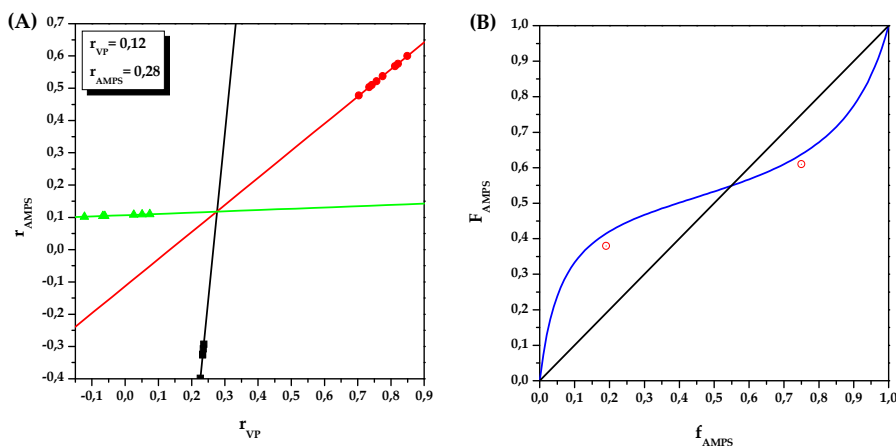


Figura IV.10. (A) Relaciones de reactividad para el sistema poli(VP-co-AMPS). (B) Diagrama de composición del sistema poli(VP-co-AMPS). f_{AMPS} : Composición de AMPS en alimentación, F_{AMPS} : composición de AMPS en el copolímero. Los círculos corresponden a los valores obtenidos en reacciones a baja conversión en dioxano-agua (80:20).

Las relaciones de reactividad de este sistema fueron previamente estudiadas por Kurenkov y colaboradores³²⁻³⁵, que observaron la fuerte influencia de la naturaleza del medio de reacción sobre estos parámetros cinéticos. Nuestros sistemas fueron sintetizados en dioxano-agua (80:20) mientras que Kurenkov lo hizo en agua, agua-etanol o DMSO. Por lo tanto, las relaciones de reactividad se calcularon con el fin de estudiar la reacción de copolimerización en estas condiciones, ya que la reactividad de monómeros polares cambia dependiendo de la polaridad del disolvente.

El sistema poli(VP-co-AMPS) presenta unas relaciones de reactividad por debajo de la unidad para ambos monómeros ($r_{VP} = 0,12$ y

$r_{AMPS} = 0,28$), por lo que nos encontramos con una copolimerización azeotrópica. Este tipo de sistemas presenta un punto característico en el diagrama de composición (Figura IV.10.B) denominado *punto azeotrópico*, en el cual la fracción molar en alimentación y en el copolímero que se forma es la misma ($f_{AMPS} = 0,55$). En este punto la copolimerización tiene lugar sin cambio en la composición del alimento. Para composiciones alejadas del azeótropo los copolímeros que se formen van a tener una composición diferente a la de alimentación. Además, el sistema presenta una moderada tendencia a formar una estructura alternante, ya que ambas especies en propagación reaccionan preferiblemente con la especie opuesta.

En la Figura IV.11 se observa la evolución de la copolimerización en el sistema poli(VP-co-AMPS) con la conversión. Para composiciones mayores que el azeótropo (línea verde), la composición de las cadenas poliméricas formadas instantáneamente son prácticamente constantes con la conversión hasta alcanzar altas conversiones en donde se obtienen secuencias ricas en VP debido a que se consume prácticamente la totalidad del AMPS (Figura IV.11. B)

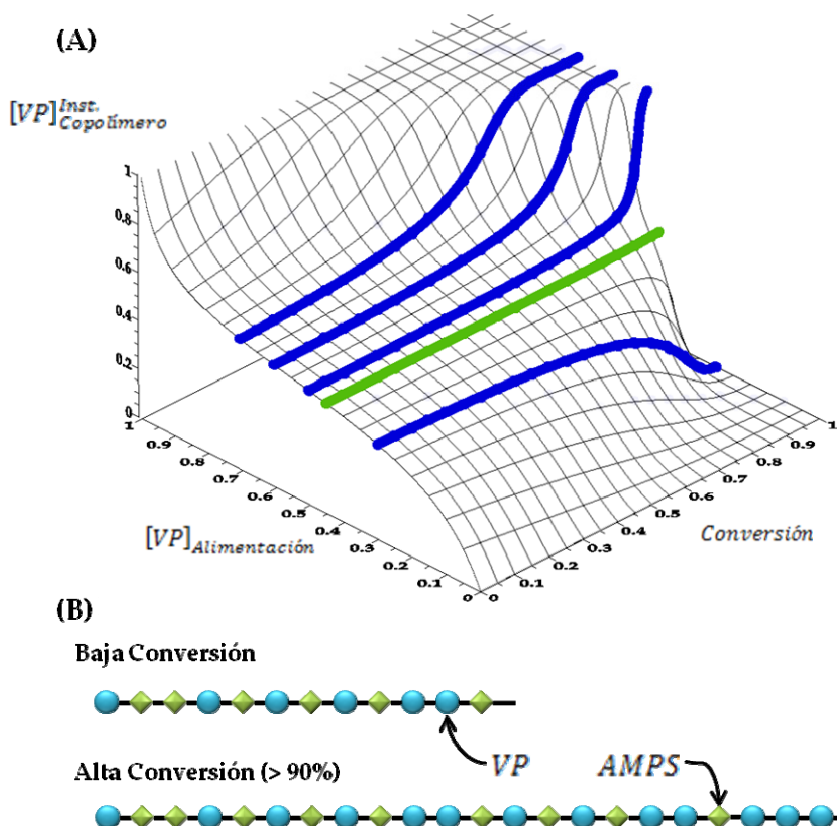


Figura IV.11. (A) Concentración instantánea de VP en los copolímeros poli(VP-co-AMPS) en función de la conversión y la concentración de VP en el alimento. Las líneas azules representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración en el alimento. ($f_{VP}= 0,3; 0,5; 0,6; 0,7$) y la línea verde el curso de la reacción para la concentración azeotrópica. **(B)** Representación esquemática de la microestructura de una reacción con una concentración inicial de VP mayor que la azeotrópica.

Para composiciones de VP por debajo del azeótropo el comportamiento del sistema es similar, por lo que se obtienen segmentos ricos en AMPS a altas conversiones.

Sistemas poliméricos basados en MANSA

En este tipo de sistemas no se ha podido realizar el estudio mediante ^1H -RMN *in situ* debido a la existencia de problemas que impiden el análisis mediante esta técnica:

- ✓ La reacción no alcanza el 100% de la conversión.
- ✓ El monómero tiene muy baja reactividad y probablemente la técnica no posee sensibilidad suficiente para monitorizar la reacción.

En esta ocasión, las relaciones de reactividad se han calculado mediante el método estándar de reacciones a baja conversión^{2, 12}. Para esto se prepararon copolímeros mediante polimerización radical a baja conversión (<10%) en las mismas condiciones que las reacciones. Éstas se detuvieron precipitándolas en acetona. Este precipitado se redisolvió en agua y se liofilizó para su posterior caracterización mediante ^1H -RMN. Una vez conocidas las composiciones en alimentación y en el copolímero se han utilizado los algoritmos de Tidwell-Mortimer¹⁴ y Levenberg-Marquard³⁶ para determinar las relaciones de reactividad.

Siguiendo esta metodología se ha estudiado el sistema poli(AB-co-MANSA), obteniéndose las siguientes parejas de valores de composiciones en alimentación y en el copolímero:

f_{AB}	F_{AB}
0,8	0,95
0,52	0,96
0,4	0,9
0,34	0,82
0,23	0,75

Tabla IV.1. Composiciones en alimentación (f) y copolímero (F) a baja conversión para el sistema poli(AB-co-MANSA).

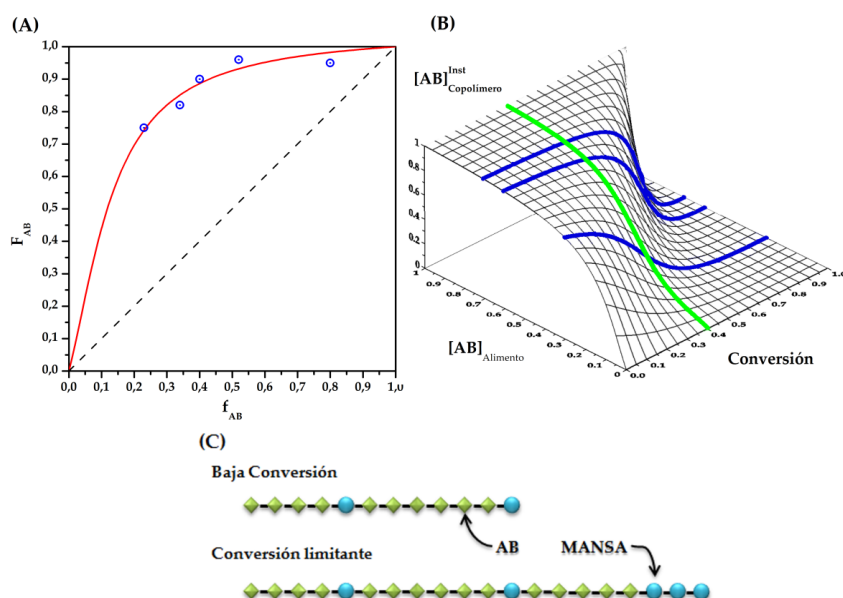


Figura IV.12. (A) Reacciones a baja conversión (círculos) y diagrama de composición para el sistema poli(AB-co-MANSA). (B) Concentración instantánea de AB en los copolímeros poli(AB-co-MANSA) en función de la conversión y la concentración de AB en el alimento. Las líneas azules representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración en el alimento. ($f_{AB} = 0,30; 0,60; 0,70$) y la línea verde representa la conversión limitante. (C) Esquema de la distribución de monómeros en la reacción.

A partir de estos valores y los algoritmos anteriormente comentados (Figura IV.12.A) se obtienen unas relaciones de reactividad de $r_{AB} = 14,71$ y $r_{MANSA} = 0,26$.

Como comprobamos en el apartado anterior, la copolimerización radical del AB y el MANSA da lugar a copolímeros con composiciones muy similares, independientemente de la composición de la alimentación inicial (Tabla III.3), por lo que hubo una gran diferencia entre la composición molar de la alimentación y la composición del copolímero. Por otra parte el índice de polidispersidad para estos copolímeros fue relativamente bajo (Tabla III.7) teniendo en cuenta que se trata de una polimerización radical. Como ya se ha comentado, esto se debe a la estabilización de los macroradicales cuando se incorporan a la cadena de copolímero, debido a la presencia de electrones deslocalizados entre el grupo metacrilato y el anillo naftaleno (Figura III.11); esto hace que el peso molecular de los copolímeros sea relativamente bajo para tratarse de copolimerización radical y que aumente de forma inversamente proporcional a la concentración de MANSA. Por otra parte, el índice de polidispersidad en la mayoría de las composiciones estudiadas se encuentra en valores cercanos a la unidad, lo cual es característico en copolimerizaciones radicales controladas con transferencia de componentes altamente estables, como se describe en los trabajos de Rizzardo y colaboradores³⁷⁻³⁹ para la polimerización RAFT (polimerización controlada por adición de agentes de transferencia de cadena) en la que se usan agentes de transferencia específicos que proporcionan una alta estabilidad a los radicales libres. El carácter altamente ionizable y las

complejas interacciones que se dan en la molécula de MANSA actúan modulando distintos pasos de la copolimerización (propagación-estabilización de los radicales libres) dando lugar a copolímeros con una distribución homogénea del peso molecular. De esta manera se observa una conversión limitante (Figura IV.12.B y Figura IV.12.C) que afecta a la incorporación de las especies menos reactivas (MANSA) con lo que se obtiene, por tanto, grandes diferencias entre la composición de los copolímeros y la inicial en alimentación.

Para el sistema poli(VP-co-MANSA) se han conseguido las siguientes parejas de valores de composiciones en alimentación y en copolímero:

f_{VP}	F_{VP}
0,2	0,72
0,4	0,88
0,5	0,93
0,7	0,97
0,8	0,96

Tabla IV.2. Composiciones en alimentación (f) y copolímero (F) a baja conversión para el sistema poli(VP-co-MANSA).

Con estos valores y los algoritmos anteriormente comentados se obtienen unas relaciones de reactividad de $r_{VP} = 13,40$ y $r_{MANSA} = 0,12$ (Figura IV.13.A).

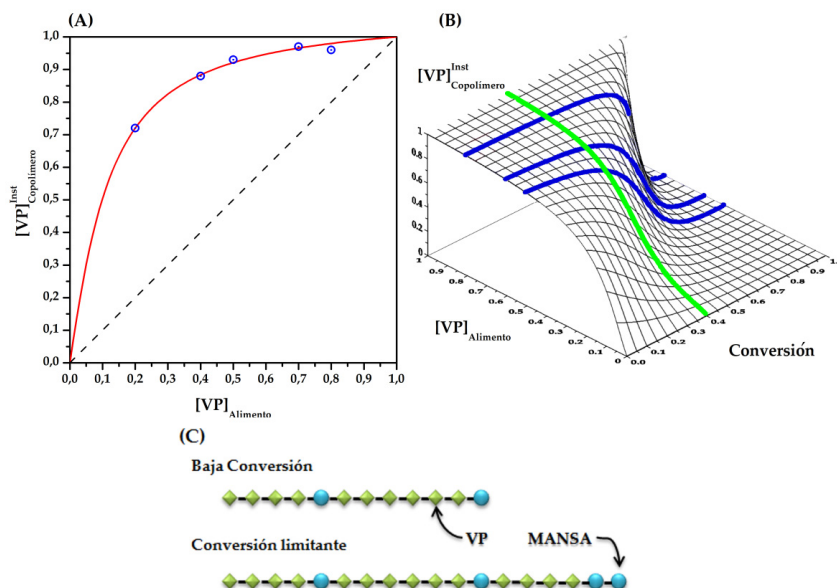


Figura IV.13. (A) Reacciones a baja conversión (círculos) y diagrama de composición para el sistema poli(VP-co-MANSA). (B) Concentración instantánea de VP en los copolímeros poli(VP-co-MANSA) en función de la conversión y la concentración de VP en el alimento. Las líneas azules representan el curso que seguiría una reacción de copolimerización para una determinada concentración en el alimento. ($f_{VP} = 0,50; 0,60; 0,80$) y la línea verde la conversión limitante. (C) Esquema de la distribución de monómeros en la reacción.

La copolimerización entre VP y MANSA sucede de forma similar al sistema anterior. La composición de los copolímeros obtenidos es muy diferente a la utilizada en la alimentación (Tabla IV.2). Los copolímeros sintetizados son de bajo peso molecular, incrementándose conforme descende la composición de MANSA. Igualmente, los índices de polidispersidad tienen valores cercanos a la unidad (Tabla IV.4); en lugar de valores mayores de 2 como corresponde a una polimerización

radical pura. Debido a esto, se vuelve a obtener una conversión limitante (Figura IV.13.B y Figura IV.13.C) que vuelve a afectar a la incorporación de MANSA.

La diferencia entre ambos sistemas va a radicar en la diferente hidrofilia de los monómeros (VP: hidrofílico o AB: hidrofóbico), lo que va a permitir diferentes conformaciones monoméricas y, por lo tanto, diferentes organizaciones supramoleculares de los sistemas sintetizados. Como estudiaremos en los próximos puntos, esta conformación va a tener un efecto importante en la actividad biológica de estas macromoléculas.

IV.3.2 Medidas de potencial zeta y tamaño de partícula

Los sistemas copoliméricos que incorporaban AB en su estructura poseen una distribución particular de monómeros con la formación de largas cadenas de AB. El carácter hidrofóbico del AB va a favorecer el autoensamblado de los copolímeros en un medio acuoso formando micelas de tamaño nanométrico. Mediante medidas de dispersión de luz y de potencial zeta de disoluciones de polímeros, hemos podido comprobar la presencia de nanopartículas en suspensión que se pueden corresponder con este tipo de estructuras.

En el caso de los sistemas con VP no se da la formación de nanoagregados debido al carácter hidrofílico de este comonomero.

Poli(AB-co-AMPS)

En la Tabla IV.3 se muestran los resultados obtenidos en las medidas de dispersión de luz dinámica y potencial zeta.

A tenor de los resultados, observamos que el copolímero con menor concentración de AMPS (25:75) no forma nanomicelas. Su índice de polidispersidad es muy elevado, lo que indica que la técnica no es capaz de determinar correctamente su diámetro hidrodinámico debido a la existencia de una gran polidispersidad o a la formación de agregados. Este copolímero puede ser que no alcance la concentración crítica de AB para que se pueda dar la formación de micelas. También se observa un valor muy bajo de potencial zeta, lo que indica que las micelas que se puedan formar no son estables.

	Tamaño de partícula		Potencial Zeta (mV)
	Diámetro hidrodinámico	Índice de polidispersidad	
Poli(AB-co-AMPS) (25:75)	346,1±24,3	0,891±0,219	-8,66±3,24
Poli(AB-co-AMPS) (50:50)	165,7±12,3	0,344±0,019	-52,4±6,31
Poli(AB-co-AMPS) (65:35)	183,2±4,49	0,418±0,052	-45,2±1,15
Poli(AB-co-AMPS) (75:25)	193,2±3,31	0,168±0,071	-40,8±2,47

Tabla IV.3. Resultados de las medidas de tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica y potencial zeta mediante movilidad electroforética en los polímeros con AMPS.

En el resto de copolímeros de AB y AMPS se observan tamaños de partículas entre 150 y 200 nm con índices de polidispersidad bajos, este tamaño de partícula corresponde a agregados multimicelares.

Además el potencial zeta medido para estos copolímeros indica que las micelas que se forman son estables y que se encuentran cargadas negativamente; debido a que en su superficie se situarán las secuencias ricas en AMPS, cuyo grupo sulfónico será el responsable de dicha carga.

Poli(AB-*co*-MANSA)

En la Tabla IV.4 se observan los resultados obtenidos en las medidas de dispersión de luz dinámica y potencial zeta. Estos datos nos sugieren que esta familia de copolímeros forma micelas en disolución acuosa entre 20 y 100 nm. El tamaño de las micelas aumenta con la concentración de AB, que es el monómero que formaría el núcleo. La obtención de un potencial zeta de valor negativo nos indica que los grupos sulfónicos del MANSA se sitúan en la superficie de la micela formando una corteza hidrofílica cargada electrostáticamente como se representa en la Figura IV.14:

	Tamaño de partícula		Potencial Zeta (mV)
	Diámetro hidrodinámico (nm)	Índice de polidispersidad	
Poli(AB- <i>co</i> -MANSA) (30:70)	21,7±0,1	0,357±0,005	-55,6±3,61
Poli(AB- <i>co</i> -MANSA) (60:40)	41,5±0,5	0,559±0,097	-43,4±9,85
Poli(AB- <i>co</i> -MANSA) (70:30)	97,3±0,2	0,274±0,080	-29,3±5,81

Tabla IV.4. Resultados de las medidas de tamaño de partícula mediante dispersión de luz dinámica y potencial zeta mediante movilidad electroforética en los polímeros con MANSA.

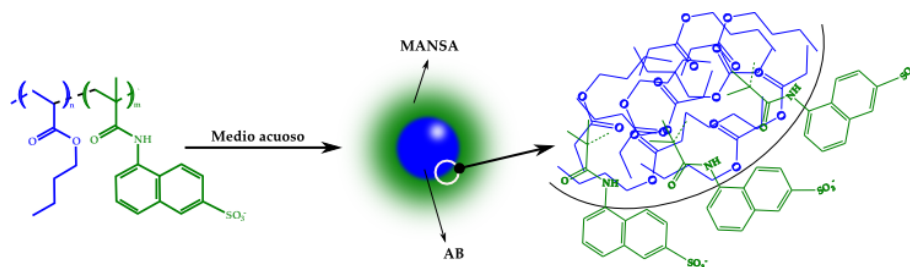


Figura IV.14. Formación de micelas de poli(AB-co-MANSA) en medio acuoso,

La magnitud del potencial zeta nos indica que las micelas formadas son estables en medio acuoso ya que presentan potenciales superiores a 30 mV en valor absoluto y disminuyen de forma directamente proporcional con la concentración de MANSA en el copolímero.

La formación de este tipo de estructuras va a situar a los grupos sulfónicos en el exterior de la micela, haciéndolos más accesibles para su interacción con los distintos factores proangiogénicos.

IV.4 Bibliografía

- (1) D.W. van Krevelen, K. t. N. Properties of Polymers: Their Correlation with Chemical Structure; Their Numerical Estimation and Prediction from Additive Group Contributions, Elsevier, Ed. 4, illustrated ed. 2009
- (2) Mayo, F. R., and Lewis, F. M. Copolymerization. I. A basis for comparing the behavior of monomers in copolymerization; the copolymerization of styrene and methyl methacrylate. *Journal of the American Chemical Society*. **1944**, 66 (9), 1594-1601.
- (3) Deliba, A.; scedil, and Soykan, C. Copolymerization of N-(4-bromophenyl)-2-methacrylamide with n-butyl methacrylate:

- Synthesis, characterization and monomer reactivity ratios. *Journal of Applied Polymer Science*. **2008**, 107 (1), 364-371.
- (4) Rahmathullah, M. A. M.; Elabd, Y. A., and Palmese, G. R. Kinetic and thermomechanical analysis of hydrophobic-hydrophilic copolymer thermosets synthesized via free-radical polymerization. *Journal of Applied Polymer Science*. **2010**, 115 (3), 1419-1427.
- (5) Dossi, M.; Liang, K.; Hutchinson, R. A., and Moscatelli, D. Investigation of Free-Radical Copolymerization Propagation Kinetics of Vinyl Acetate and Methyl Methacrylate. *The Journal of Physical Chemistry B*. **2010**, 114 (12), 4213-4222.
- (6) Fukuda, T.; Kubo, K., and Ma, Y. D. Kinetics of free radical copolymerization. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. **1992**, 17 (5), 875-916.
- (7) Harada, A., and Kataoka, K. Supramolecular assemblies of block copolymers in aqueous media as nanocontainers relevant to biological applications. *Progress in Polymer Science (Oxford)*. **2006**, 31 (11), 949-982.
- (8) Amir, R. J.; Zhong, S.; Pochan, D. J., and Hawker, C. J. Enzymatically triggered self-assembly of block copolymers. *Journal of the American Chemical Society*. **2009**, 131 (39), 13949-13951.
- (9) Cao, X. H.; Liu, Y. H.; Peng, D. F.; Xie, Z. B., and Meng, L. Z. Preparation of a novel self-assembled star copolymer and its performance in thermo and pH dual-responsive drug release. *Xiandai Huagong/Modern Chemical Industry*. **2009**, 29 (10).
- (10) Fujioka, T.; Taketani, S.; Nagasaki, T., and Matsumoto, A. Self-assembly and cellular uptake of degradable and water-soluble polyperoxides. *Bioconjugate Chemistry*. **2009**, 20 (10), 1879-1887.
- (11) A. Gallardo, A. L. Polimerización, In *Ciencia y Tecnología de Materiales Poliméricos* Polímeros, ICTP, Ed., CSIC, Madrid. 2004, 23-124
- (12) Fineman, M., and Ross, S. D. Linear method for determining monomer reactivity ratios in copolymerization. *Journal of Polymer Science*. **1950**, 5 (2), 259-262.
- (13) Kelen, T., and Tudos, F. Analysis of the linear methods for determining copolymerization reactivity ratios. I. A new

- improved linear graphic method. *J Macromol Chem.* **1975**, A9 1-27.
- (14) Tidwell, P. W., and Mortimer, G. A. An improved method of calculating copolymerization reactivity ratios. *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry.* **1965**, 3 369-387.
- (15) Behnken, D. W. Estimation of copolymer reactivity ratios: An example of nonlinear estimation. *Journal of Polymer Science Part A: General Papers.* **1964**, 2 (2), 645-668.
- (16) O'Driscoll, K. Free radical polymerization, kinetics and mechanisms. 1987
- (17) Kruse, R. L. The simplified calculation of average copolymer composition versus extent of polymerization. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Letters.* **1967**, 5 (5), 437-440.
- (18) Mao, R., and Huglin, M. B. A new linear method to calculate monomer reactivity ratios by using high conversion copolymerization data: terminal model. *Polymer.* **1993**, 34 (8), 1709-1715.
- (19) Mao, R., and Huglin, M. B. A new linear method to calculate monomer reactivity ratios by using high-conversion copolymerization data: penultimate model with $r_2=0$. *Polymer.* **1994**, 35 (16), 3525-3529.
- (20) Aguilar, M. R.; Gallardo, A.; Fernández, M. M., and San Román, J. In situ quantitative ^1H NMR monitoring of monomer consumption: a simple and fast way of estimating reactivity ratios. *Macromolecules.* **2002**, 35 2036-2041.
- (21) Skeist, I. Copolymerization: The composition distribution curve. *Journal of the American Chemical Society.* **1946**, 68 (9), 1781-1784.
- (22) Xu, R. Particle characterization: light scattering methods. 2002
- (23) Kätzel, U.; Bedrich, R.; Stintz, M.; Ketzmerick, R.; Gottschalk-Gaudig, T., and Barthel, H. Dynamic Light Scattering for the Characterization of Polydisperse Fractal Systems: I. Simulation of the Diffusional Behavior. *Particle & Particle Systems Characterization.* **2008**, 25 (1), 9-18.
- (24) Pecora, R. Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids. *Journal of Nanoparticle Research.* **2000**, 2 (2), 123-131.

-
- (25) Hunter, R. J. Zeta potential in colloid science : principles and applications. 1981
 - (26) ASTM. (1985) Zeta potential of colloids in water and waste water.
 - (27) Lyklema, J. Fundamentals of interface and colloid science. 2000
 - (28) Sun, Z.; Xu, S.; Dai, G.; Li, Y.; Lou, L.; Liu, Q., and Zhu, R. A microscopic approach to studying colloidal stability. *Journal of Chemical Physics*. **2003**, 119 (4), 2399-2405.
 - (29) Evans, D. F., and Wennerström, H. The colloidal domain : where physics, chemistry, biology, and technology meet. 1999
 - (30) Abramson, H. A.; Moyer, L. S., and Gorin, M. H. Electrophoresis of proteins and the chemistry of cell surfaces. 1942
 - (31) Gallardo, A.; Aguilar, M. R.; Abraham, G., and San Román, J. Chain copolymerization reactions: an algorithm to predict the reaction evolution with conversion. *J Chem Ed*. **2004**, 81 1210-1215.
 - (32) Kurenkov, V. F.; Khabibullina, G. Z., and Zaitseva, N. N. Radical copolymerization of sodium 2-acrylamido-2-methyl-2-propanesulfonate with N-vinyl-2-pyrrolidone in water and aqueous salt solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2002**, 75 (11), 1855-1858.
 - (33) Kurenkov, V. F.; Zaitseva, N. N.; Zhelonkina, T. A., and Lobanov, F. I. Degradation of copolymers of N-vinylpyrrolidone with sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate in aqueous solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2003**, 76 (6), 981-984.
 - (34) Kurenkov, V. F., and Zhelonkina, T. A. Copolymerization of sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate with N-vinylpyrrolidone in water and dimethyl sulfoxide. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2004**, 77 (2), 307-312.
 - (35) Kurenkov, V. F.; Zhelonkina, T. A., and Kovalenko, V. I. Concentration effect in copolymerization of sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate with N-vinylpyrrolidone in aqueous solutions. *Russian Journal of Applied Chemistry*. **2005**, 78 (2), 295-300.
 - (36) More, J. J. Levenberg--Marquardt algorithm: implementation and theory. 1977
-

- (37) Moad, G.; Chong, Y. K.; Skidmore, M. A.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. (2008) Advances in raft polymerization: Improved nanostructured materials, 1 ed., pp 293-294, American Chemical Society, Polymer Preprints, Division of Polymer Chemistry, New Orleans, LA.
- (38) Moad, G.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. Toward living radical polymerization. *Accounts of chemical research*. **2008**, 41 (9), 1133-1142.
- (39) Moad, G.; Rizzardo, E., and Thang, S. H. Living radical polymerization by the RAFT process A second update. *Australian Journal of Chemistry*. **2009**, 62 (11), 1402-1472.

V. Inhibición *in vitro* de la mitogénesis inducida por aFGF

V.1 Introducción

El crecimiento y desarrollo de nuevas redes de vasos sanguíneos es un punto crítico en el desarrollo de tumores sólidos, además de contribuir a la difusión de células tumorales a otros órganos¹⁻². Por lo tanto, la inhibición de la angiogénesis fue propuesta como una estrategia novedosa para el tratamiento de tumores³⁻⁵ y actualmente está en la vanguardia de uno de los campos más prometedores de la investigación contra el cáncer, por ello podemos encontrar numerosos agentes antiangiogénicos en diversas fases de ensayo clínico⁶⁻⁸. Un ejemplo de la actual lucha contra el cáncer es el trabajo del Profesor Joan Massagué (Figura V.1), cuya investigación se basa en la inhibición de los genes que actúan en las distintas etapas del crecimiento tumoral y la metástasis⁹⁻¹¹ siendo una de estas etapas la angiogénesis tumoral.

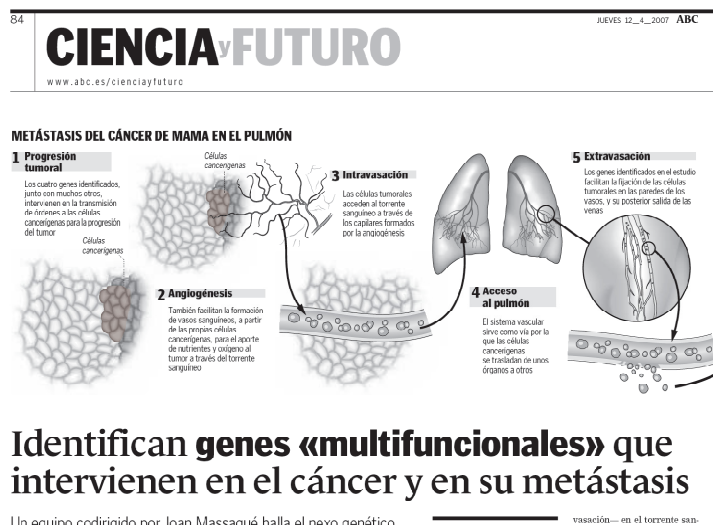


Figura V.1. Recorte de prensa de ABC sobre la investigación del Dr. Joan Massagué.

Numerosos estudios histológicos han demostrado que el crecimiento de tumores sólidos puede ser suprimido mediante el uso de anticuerpos monoclonales contra determinados factores de crecimientos que son habitualmente detectables en los tumores, como son los FGF y VEGF¹²⁻¹³. Por lo tanto, la inhibición de la actividad mitogénica de factores como el FGF puede ser un punto crucial en el desarrollo de nuevos tratamientos para la lucha contra el cáncer.

Tanto el VEGF como el FGF poseen una alta afinidad frente a la heparina y glicosaminoglicanos tipo heparán sulfato (HSPG). Como se detalló en la introducción de esta tesis, la unión de los factores de crecimiento con este tipo de moléculas es necesaria para que puedan ser reconocidos por los receptores de la membrana celular¹⁴. Así, la limitación de las interacciones entre los factores de crecimiento con heparinas y glicosaminoglicanos se presenta como una estrategia prometedora para la inhibición de la angiogénesis. En este sentido el poli(AMPS) y el ANSA han demostrado poseer una importante capacidad para inhibir la mitogénesis inducida por FGF¹⁵⁻¹⁶. El mecanismo de acción de ambos compuestos es diferente y se explica a continuación.

V.1.1 Actividad antiangiogénica del poli(AMPS)

Liekens y colaboradores¹⁷ han demostrado que compuestos polisulfonados con estructuras químicas y tamaños distintos pueden actuar como antagonistas de los FGF debido a la similitud con algunas de las características funcionales de la heparina/heparán sulfato. Dichos estudios han demostrado la capacidad de los compuestos polisulfona-

dos de impedir la unión de los FGF, HSPG y FGFR en células endoteliales cultivadas, evitándose de esta forma la formación del complejo ternario, y por lo tanto, evitando la activación de las cascada de señales que dan lugar a la angiogénesis.

A partir de los estudios de Faham¹⁸ y Liekens¹⁹ se identificó una zona de unión específica de los FGF con la heparina sobre la que interacciona el poli(AMPS) impidiendo la interacción FGF-Heparina (Figura V.2).

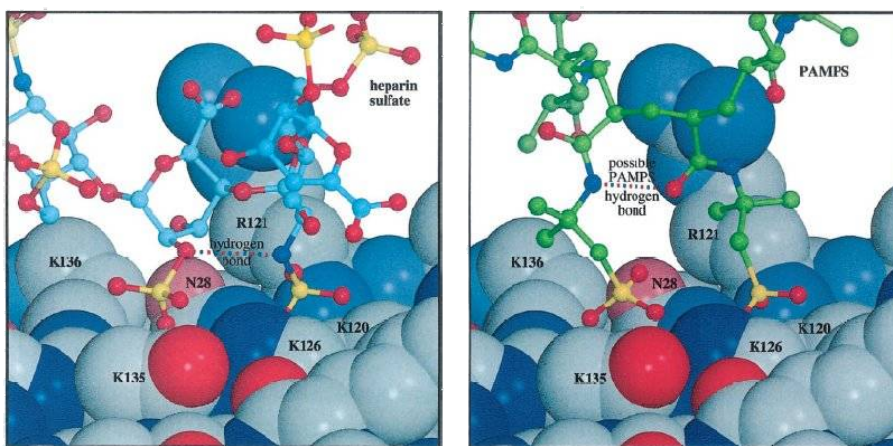


Figura V.2. Similitud entre los complejos formados entre la heparina-FGF y el Poli(AMPS)-FGF¹⁶.

Esta interacción entre el poli(AMPS) y el FGF es posible debido a que durante la polimerización el poli(AMPS) desarrolla un centro asimétrico en el carbono central de las unidades acrilamidas que da lugar a la formación de puentes de hidrógeno entre unidades con la misma conformación. Con estas condiciones el polímero adquiere una estructura en forma de hélice con los grupos sulfónicos en el exterior

separados entre 9 y 10 Å. La configuración en hélice del poli(AMPS) permite su acoplamiento al FGF sin distorsionar la configuración helicoidal. En esta unión los grupos sulfónicos del AMPS interaccionan con los mismos aminoácidos que la heparina e impiden la unión de ésta al FGF y por lo tanto se inhibe su unión a los correspondientes receptores que iniciarían el proceso de angiogénesis.

V.1.2 Actividad antiangiogénica del ANSA

El modo de acción del ANSA es totalmente diferente al del AMPS. El ANSA se une al factor de crecimiento modificando su estructura e impidiendo la unión de la heparina a los FGF. Tornero y colaboradores¹⁵ han demostrado que el ANSA se une directamente con una estequiometría 1:1 a una cavidad cargada positivamente que se encuentra sobre la superficie del factor de crecimiento. En estudios anteriores, se ha demostrado que esta región corresponde a la zona de unión de la heparina con el FGF²⁰. El anclaje del ANSA sobre la zona de unión de la heparina provoca que varios restos de aminoácidos de la proteína, que están implicados con la unión a la heparina, interaccionen con el ANSA mediante puentes de hidrógeno (con el grupo sulfónico) e interacciones hidrofóbicas (con el anillo del naftaleno), provocando cambios estructurales en la proteína (Figura V.3) que van a obstaculizar la interacción del FGF con su receptor de alta afinidad.

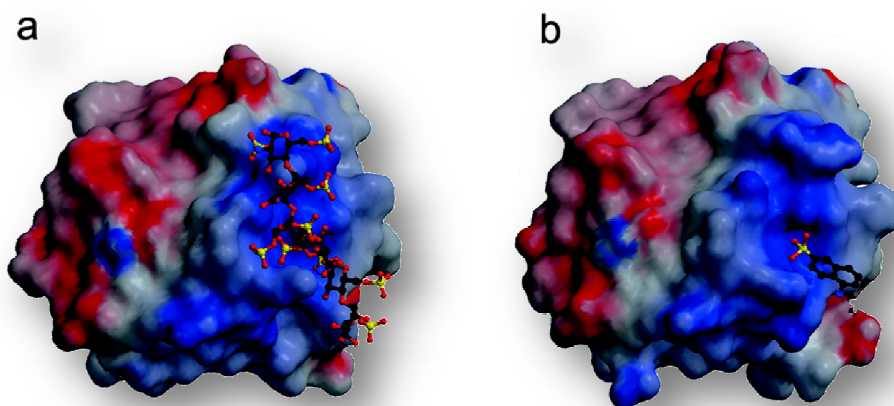


Figura V.3. (a) Representación de la zona de unión del FGF con la heparina. (b) Representación de la zona de unión del FGF con el ANSA¹⁵.

V.1.3 Titulación calorimétrica isotérmica

Las interacciones entre los polímeros sintetizados y el FGF se estudiaron mediante titulación calorimetría isotérmica (ITC). Esta técnica no sólo proporciona información acerca de la mayor o menor afinidad de ambos compuestos, sino que además indica el tipo de interacción predominante (electrostática o covalente, exotérmica o endotérmica).

La ITC es una técnica experimental calorimétrica que mide directamente el calor asociado a los fenómenos de interacción entre diversas moléculas o componentes. Este calor asociado equivale a la entalpía del proceso si se mide a presión constante. Es frecuentemente usada en estudios de bioquímica, física, biotecnología, biomedicina y farmacología ya que permite determinar cuantitativamente, de manera directa, la entalpía de unión de una molécula o de un complejo molecular sin ne-

cesidad de modelos o hipótesis adicionales. De esta manera se puede estudiar el perfil termodinámico de la interacción entre distintas moléculas mediante la determinación de las distintas magnitudes termodinámicas que caracterizan esta unión²¹⁻²².

El equipo utilizado para la técnica del ITC es un calorímetro que funciona por compensación del efecto térmico en un entorno adiabático (Figura V.4).

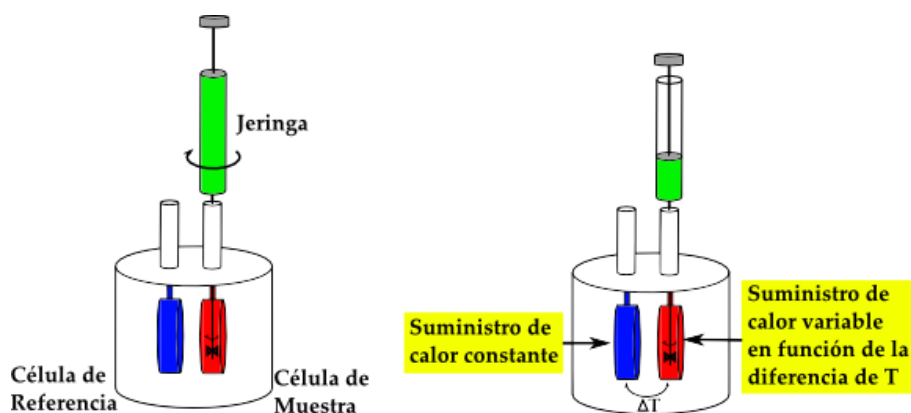


Figura V.4. Esquema del sistema para la titulación calorimétrica.

El equipo consta de dos células idénticas de aproximadamente 1,4 mL de volumen. La célula de muestra es aquella en la que se introduce la disolución problema y la de referencia se llena siempre de agua Milli-Q, evitando la presencia de burbujas. Para ello el calorímetro dispone de un accesorio auxiliar, Thermo Vac, que sirve para limpiar la célula, desgasificar y termostatar el agua y las muestras mediante un vacío de -860 mbares y agitación magnética.

Seguidamente, en la célula de muestra se acopla un ensamblaje inyector-agitador denominado autopipeta, que consiste en una jeringa larga de 250 μL con una paleta de agitación en el extremo. Todo ello acoplado magnéticamente a un motor de alta precisión que rota a velocidad constante, y que no necesita hacer una corrección del calor de fricción en la agitación. La célula de referencia actúa únicamente como una prueba de temperatura y no es agitada.

Para la realización de las medidas, ambas células deben estar completamente llenas de líquido. Un dispositivo termoeléctrico mide la diferencia de temperatura entre la célula de muestra y la de referencia, ΔT_1 , mientras que un termopar mide la diferencia de temperatura, ΔT_2 , entre el revestimiento y las células. Después se aplicará una potencia pequeña y constante sobre la célula de referencia, de forma que ΔT_1 tienda a ser negativo. Esta señal, no cero, activa una red de retroalimentación a la célula de muestra, que suministra potencia o calor a la célula de muestra haciendo que ΔT_1 sea de nuevo, igual a cero.

El calorímetro mide la diferencia de temperatura entre la célula de referencia y la de la muestra, calibrándolas como unidades de diferencia de potencial (DP) entre las dos células. Como resultado de inyectar un reactivo en la célula de muestra aparece una reacción exotérmica que induce un cambio negativo en la señal DP, puesto que el calor cedido hace que se requiera menos potencia de retroalimentación para anular ΔT_1 . Lo opuesto se cumple para reacciones endotérmicas.

Esta señal DP está continuamente monitorizada y como tiene unidades de potencial, su integral temporal nos da el calor intercambiado como resultado de la inyección. Un mecanismo similar de retroalimentación es activado para la señal ΔT_2 con el fin de que el revestimiento mantenga la misma temperatura que la media de la que tengan las células. Todo el conjunto está rodeado de un aislante de metano para minimizar el intercambio de calor con el entorno.

Un experimento convencional de ITC está constituido por una serie de inyecciones de un volumen determinado separadas por un intervalo de tiempo suficiente para asegurar que se alcanza el equilibrio y que el sistema ha compensado todo el calor liberado o absorbido. Suponiendo que no existen otros procesos que interfieran en la reacción; el comportamiento del sistema se describe adecuadamente a través del modelo de unión de un ligando a una macromolécula. El análisis termodinámico estadístico de un proceso de unión con estas características nos demuestra que la función de partición de unión (Z), que describe las poblaciones de los diferentes estados moleculares accesibles del sistema, es:

$$Z = (1 + K[L])^n \quad \text{(Ecuación V.I)}$$

donde K es la constante de equilibrio por sitio de unión, $[L]$ la concentración de ligando libre y n es el número de sitios de unión de la macromolécula para el ligando. La razón de la concentración de ligando unido, $[L]_b$ entre la concentración de macromolécula total se conoce

como parámetro de unión y está relacionado con la función de partición por:

$$\bar{v} = \frac{[L]_b}{[M]_T} = \frac{\partial \ln Z}{\partial \ln [L]} = \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad (\text{Ecuación V.2})$$

Con las condiciones que supusimos al inicio se puede seguir un desarrollo matemático para el cálculo del calor de interacción²²⁻²⁵:

El calor liberado o absorbido en una inyección cualquiera será:

$$q_i = \Delta H_{ap} \cdot \Delta L_b \quad (\text{Ecuación V.3})$$

donde L_b representa los moles de ligando unido y ΔH_{ap} es el cambio de entalpía aparente por mol de ligando unido.

Si definimos el volumen de la célula como V_c la ecuación anterior se puede expresar como:

$$q_i = \Delta H_b \cdot V_c \cdot ([L]_{b,i} - [L]_{b,i-1}) = \Delta H_{ap} \cdot V_c \cdot (\bar{v}_i \cdot [M]_i - \bar{v}_{i-1} \cdot [M]_{i-1})$$

(Ecuación V.4)

donde $[L]_i$ es la concentración de ligando unido y $[M]_i$ la de macromolécula en la célula.

A partir de estas ecuaciones se puede calcular el calor total acumulado después de N inyecciones como:

$$Q = \sum_{i=1}^N q_i = \Delta H_{ap} \cdot V_c \cdot \bar{v}_N \cdot [M]_N = \Delta H_{ap} \cdot V_c \cdot [M]_N \cdot \frac{nK[L]}{1 + K[L]}$$

(Ecuación V.5)

El problema de esta ecuación reside en que la variable $[L]$ no se puede conocer durante el transcurso de la reacción, por lo que se expresa en función de variables experimentales:

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - \frac{Q}{V_C \cdot \Delta H_{ap}} \quad (\text{Ecuación V.6})$$

Si sustituimos en la ecuación V.5 obtenemos una ecuación de segundo grado en Q que al resolver nos queda la siguiente solución (Ecuación V.7):

$$Q = \frac{V_C \cdot \Delta H_{ap}}{2K} \cdot \left[1 + K[L]_T + nK[M]_T - \sqrt{(1 + K[L]_T + nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T[L]_T} \right]$$

(Ecuación V.7)

Esta ecuación nos relaciona el calor acumulado tras N inyecciones con variables experimentales (V_C , $[L]_T$ y $[M]_T$). Por otro lado la ecuación V.6 se puede expresar también como:

$$[L] = [L]_T - [L]_b = [L]_T - [M]_T \cdot \frac{nK[L]}{1 + K[L]} \quad (\text{Ecuación V.8})$$

Si en esta ecuación despejamos $[L]$ vamos a tener una forma de calcularlo a partir de parámetros conocidos:

$$[L] = \frac{1}{2K} \cdot \left[-1 - K[M]_T + nK[M]_T - \sqrt{(1 - K[L]_T + nK[M]_T)^2 + 4K[L]_T} \right]$$

(Ecuación V.9)

Si derivamos la ecuación V.7 se obtiene la siguiente expresión:

$$\frac{1}{V_c} \cdot \frac{dQ}{d[L]_T} \approx \frac{1}{V_c} \cdot \frac{\Delta Q}{\Delta[L]_T} = \frac{\Delta H}{2} \cdot \left[\frac{1 + K[M]_T \cdot \theta - nK[M]_T}{\sqrt{(1 + K[M]_T \cdot \theta - nK[M]_T)^2 - 4nK^2[M]_T \cdot \theta}} \right]$$

(Ecuación V.10)

$$\text{Donde } \theta = \frac{[L]_T}{[M]_T}.$$

Los datos experimentales se pueden utilizar para realizar una representación del calor correspondiente a la titulación frente a la razón molar $[L]_T/[M]_T$ (isoterma de unión). Realizando un ajuste no lineal de esta isoterma a la ecuación (V.10) es posible obtener los parámetros n , K y ΔH de la interacción en estudio.

El resto de parámetros termodinámicos se pueden calcular haciendo uso de las ecuaciones fundamentales de la termodinámica:

$$\Delta G = -RT \ln K = \Delta H - T\Delta S \quad (\text{Ecuación V.11})$$

De esta forma se obtienen todos los parámetros termodinámicos con los que caracterizar las interacciones objeto de estudio:

- ΔH : Nos indica si la reacción es exotérmica o endotérmica.
- ΔS : Su signo nos indica que tipo de reacción estamos estudiando. Si $\Delta S < 0$ la interacción será preferentemente electrostática, mientras que si $\Delta S > 0$ entonces las interacciones serán preferentemente covalentes.
- K : Es la constante de afinidad y cuanto mayor sea su valor mayor afinidad tendrán las moléculas para interaccionar.

V.2 Materiales y métodos

En este capítulo se han utilizado los polímeros sintetizados y descritos en el capítulo II, después de haberlos sometido a un proceso de diálisis y liofilización para eliminar cualquier resto de monómero y disolvente que pudieran contener. Los ensayos de actividad biológica se han realizado mediante el estudio de la inhibición de la proliferación de fibroblastos Balb/c 3T3 (línea CRL-1658 de la Colección Americana de Cultivos Celulares -ATCC-), que son dependientes del factor de crecimiento para fibroblastos ácido.

V.2.1 Ensayos de inhibición de la mitogénesis inducida por aFGF

Para la realización de este ensayo se han utilizado fibroblastos Balb/c 3T3 resuspendidos en medio completo (DMEM suplementado con 10% suero de ternera), a una densidad de 9000 células/ml. Éstos se siembran en un volumen de 200 μ L en placas de 96 pocillos (densidad 1800 células por pocillo). Después de 6 horas de incubación en la estufa de cultivos (37 °C y 5% CO₂), el medio de cultivo se elimina y se añaden 100 μ L de medio mínimo (DMEM/Ham's F-12) por pocillo. Tras 14 horas de incubación en la estufa de cultivos, se añade al pocillo 10 μ L de una disolución en DMEM (0,1% BSA) que contiene el factor de crecimiento de fibroblastos ácido (6,40 ng/ml) y heparina de 3KDa (100 μ g/ml). A esta disolución se le añaden concentraciones crecientes del polímero (de 0 a 10 mg/ml) cuya actividad biológica se quiere estudiar. De esta forma, las concentraciones finales en el pocillo aproximadas son

640 pg/ml de aFGF, 10 µg/ml de heparina y de 0 a 1 mg/ml del polímero cuya actividad biológica se quiere estudiar.

Después de 72 horas de incubación, las células se fijan al pocillo añadiendo 10 µl de una disolución de glutaraldehído al 25% e incubándolas a temperatura ambiente durante 10 minutos. Seguidamente, se lavan con agua milli-Q, para eliminar los restos de glutaraldehído y se secan a 37 °C. Una vez secas, se tiñe la placa añadiendo al pocillo 100 µl de una disolución de cristal violeta (1mg/ml) en tampón fosfato 50mM pH 7,2, se agita y se incuba durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se retira la disolución y se lava de nuevo con agua milli-Q para eliminar el exceso de colorante y se seca de nuevo la placa a 37 °C. Finalmente, se añaden 100 µl de una disolución de ácido acético al 10%, se agita y se mide absorción diferencial (A620 nm-A690 nm) en un lector de placas. La proliferación celular está directamente relacionada con la cantidad de cristal violeta absorbido por las células.

V.2.2 Grado de citotoxicidad

Para valorar el grado de citotoxicidad de los polímeros sobre los fibroblastos se sigue la misma metodología descrita anteriormente. La diferencia reside en que la disolución que se añade al pocillo contiene únicamente heparina y el polímero en estudio y no aFGF; así se observa si la presencia de polímero influye en la mortalidad de los fibroblastos.

V.2.3 Estudio de las interacciones polímero-FGF y heparina-FGF

Para el análisis de las interacciones entre los polímeros estudiados y el factor de crecimiento FGF, por la técnica de ITC, se ha trabajado a 37 °C y en medio tamponado HEPES 30 mM-EDTA 0,1 mM a pH 7,2. Para la realización de las medidas se preparan disoluciones de los polímeros de $9,66 \cdot 10^{-2}$ mM, considerando esta concentración, óptima para su solubilidad y detección de los parámetros estudiados en la interacción con el factor de crecimiento FGF, cuya concentración ha sido de $1,89 \cdot 10^{-2}$ mM.

Para las medidas del calor de interacción se han realizado 37 inyecciones de 7 µL cada una. Tras cada inyección el equipo aplica una potencia de 30 µCal para volver a equilibrar el sistema, midiendo el calor que debe suministrar para esto. A partir de estos datos el software del calorímetro proporciona los valores de entalpía, entropía y de la constante de afinidad, ajustando el sistema a un solo tipo de sitios de unión.

V.3 Resultados y discusión

V.3.1 Ensayos biológicos

Como se comentó anteriormente, para estos ensayos se han utilizado fibroblastos Balb/c-3T3 que crecen adheridos a la superficie del fondo del pocillo y a los que se les ha añadido disoluciones de los distintos copolímeros a estudiar y una disolución con el aFGF.

Sistemas basados en AMPS

En la Figura V.5 se muestra el efecto con la concentración de los distintos copolímeros del sistema poli(AB-*co*-AMPS) sobre la mitogénesis celular inducida por aFGF y su toxicidad.

La presencia del aFGF induce la mitogénesis de los fibroblastos y la presencia de esta familia de polímeros compensa e inhibe esta actividad en función de la concentración del polímero añadido y la concentración de AMPS en el copolímero. Analizándolos detalladamente, podemos observar que el sistema poli(AB-*co*-AMPS) (25:75) presenta una inhibición sostenida de la mitogénesis en función de la concentración de polímero en el medio. Este copolímero, que es el de mayor concentración de AMPS, es activo en todo el rango de composiciones ensayado, mientras que el sistema poli(AB-*co*-AMPS) (75:25) no fue activo hasta composiciones superiores a los 125 µg/ml. Sin embargo, la actividad de este copolímero alcanza valores muy superiores, llegando prácticamente a la inhibición total a concentraciones de 1000 µg/ml. Por otro lado, los copolímeros poli(AB-*co*-AMPS) (50:50) presenta un comportamiento intermedio entre ambos sistemas. Por lo tanto la actividad antimitogénica de este sistema depende no sólo de la concentración del copolímero en el medio, sino también de la composición molar del propio copolímero.

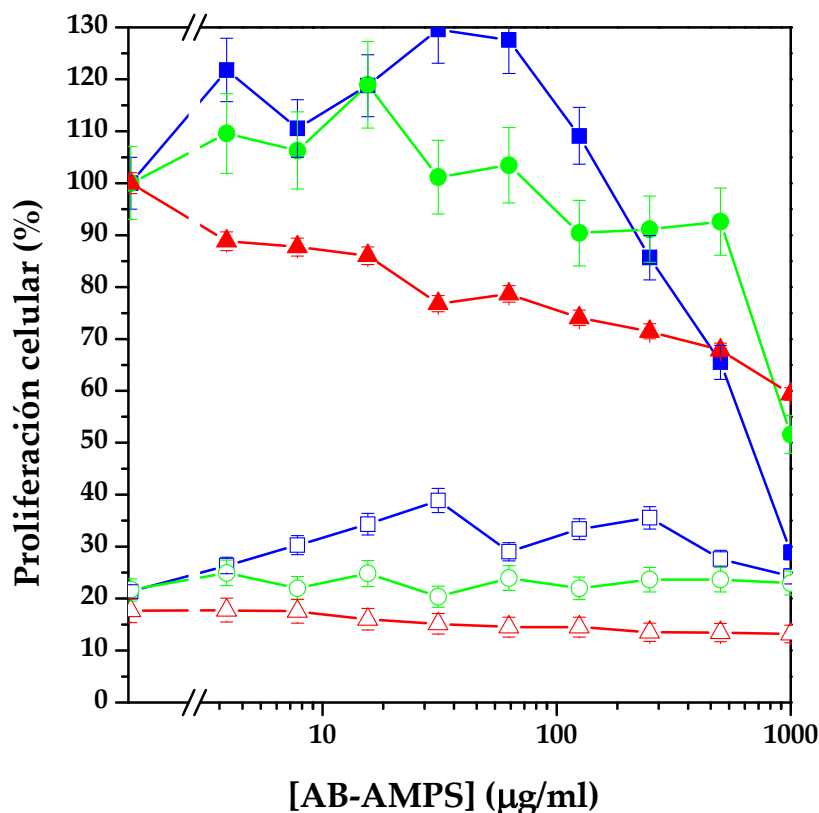


Figura V.5. Efecto de los copolímeros del sistema poli(AB-co-AMPS) en la proliferación celular de fibroblastos Balb/c 3T3. Símbolos rellenos: proliferación inducida por aFGF activado por heparina. Símbolo vacío: Ensayo de toxicidad. En azul poli(AB-co-AMPS) (75:25), en verde poli(AB-co-AMPS) (50:50) y en rojo poli(AB-co-AMPS) (25:75).

En el ensayo de toxicidad se ha comprobado que ninguno de los sistemas copoliméricos utilizados tiene efecto sobre las células a las que no se les añadió el aFGF. Este hecho se corrobora con las imágenes al microscopio, donde no se observa la presencia de signos que indiquen que los polímeros tienen un efecto tóxico sobre las células: células en suspensión, lisis, etc. (Figura V.6)

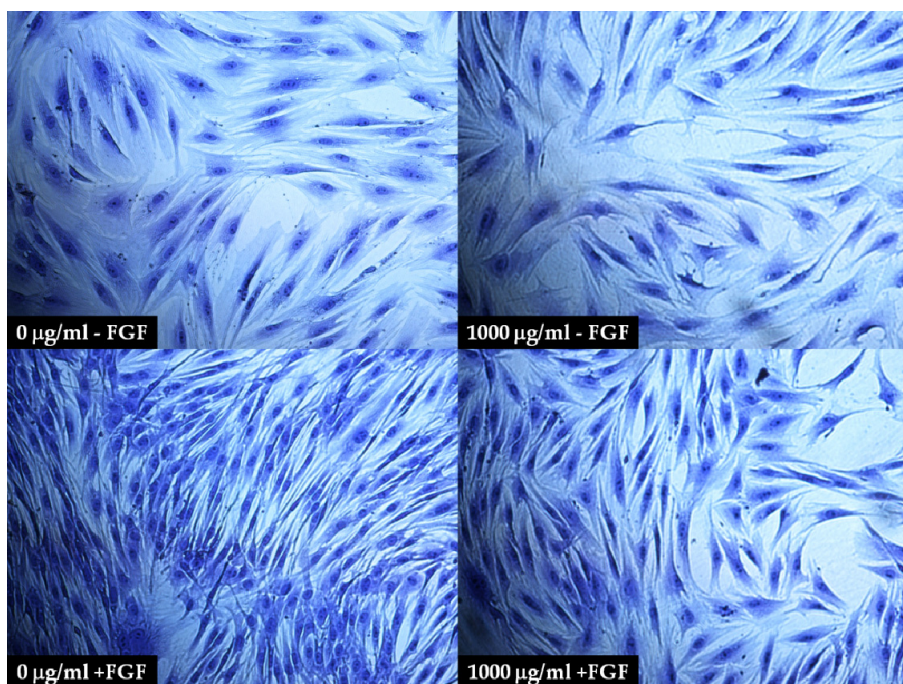


Figura V.6. Imagen al microscopio óptico de las células teñidas con cristal violeta en presencia (+) o ausencia (-) de aFGF y/o presencia (1000 µg/ml) o ausencia (0 µg/ml) de copolímero poli(AB-co-AMPS) (25:75).

En la Figura V.7 se muestra el efecto de los copolímeros del sistema poli(VP-co-AMPS). En este caso ninguno de los copolímeros tiene un efecto claro sobre la proliferación de fibroblastos, siendo ésta siempre mayor al 80% en todo el rango de concentraciones ensayado y no mostrando, al igual que en el caso anterior, citotoxicidad alguna sobre las células.

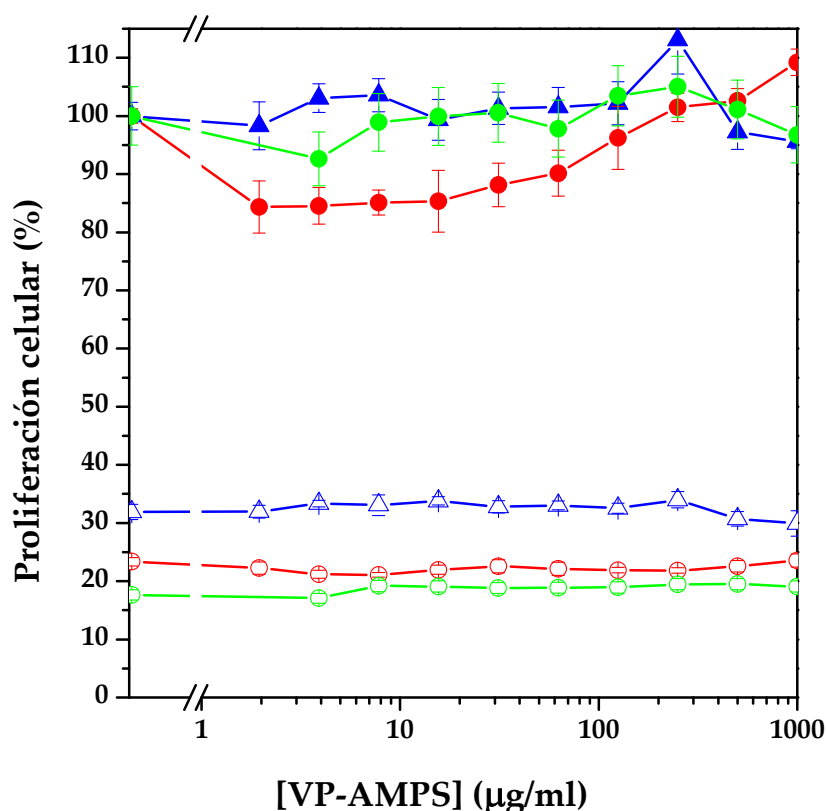


Figura V.7. Efecto de los copolímeros del sistema poli(VP-co-AMPS) en la proliferación celular de fibroblastos Balb/c 3T3. Símbolos rellenos: proliferación inducida por aFGF activado por heparina. Símbolo vacío: Ensayo de toxicidad. En azul poli(VP-co-AMPS) (70:30), en verde poli(VP-co-AMPS) (60:40) y en rojo poli(VP-co-AMPS) (30:70).

Como vimos en el trabajo de Liekens^{17, 19} sobre las interacciones poli(AMPS)-FGF, se puede considerar que la diferencia de actividad biológica en estos copolímeros puede deberse a la diferente distribución de monómeros en la cadena polimérica (microestructura). Como se estudió en el capítulo anterior el sistema poli(AB-co-AMPS), presenta unas relaciones de reactividad que predicen la formación de cadenas

poliméricas con zonas ricas en AB y zonas ricas en AMPS. Por tanto, este sistema presenta altas probabilidades de presentar largas secuencias de AMPS en la cadena polimérica y, en consecuencia, la formación de la estructura adecuada para su interacción con los aFGF inhibiendo su unión con los receptores correspondientes.

Por otro lado, el sistema poli(VP-co-AMPS) es un sistema azeotrópico, por lo que durante la polimerización se forman preferentemente cadenas alternantes con baja probabilidad de encontrar secuencias de AMPS en disposición helicoidal que interaccionen con el aFGF. Explicándose así las diferencias de actividad de ambos sistemas.

Sistemas basados en MANSA

En la Figura V.8 se muestran los resultados obtenidos en el ensayo de inhibición de la mitogénesis de fibroblastos inducida por aFGF para el sistema poli(AB-co-MANSA).

En la gráfica se observa que el efecto mitogénico, debido a la presencia del aFGF, es claramente inhibido por la presencia de los diferentes polímeros sintetizados en función de su concentración en el medio (Figura V.9); llegando a inhibirlo completamente a concentraciones entre 100 y 300 $\mu\text{g/ml}$. Además, en el ensayo de toxicidad los copolímeros no muestran ningún efecto adverso sobre el crecimiento celular demostrando su baja citotoxicidad.

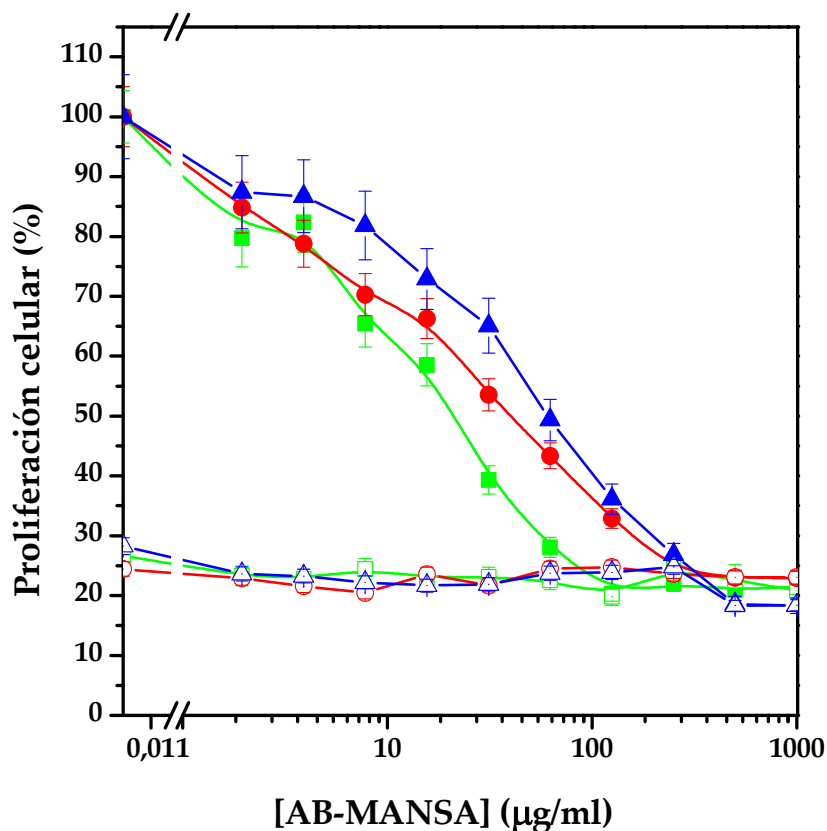


Figura V.8. Efecto de los copolímeros del sistema poli(AB-co-MANSA) en la proliferación celular de fibroblastos Balb/c 3T3. Símbolos rellenos: proliferación inducida por aFGF activado por heparina. Símbolo vacío: Ensayo de toxicidad. En negro poli(AB-co-MANSA) (70:30), en azul poli(AB-co-MANSA) (60:40) y en rojo poli(AB-co-MANSA) (30:70).

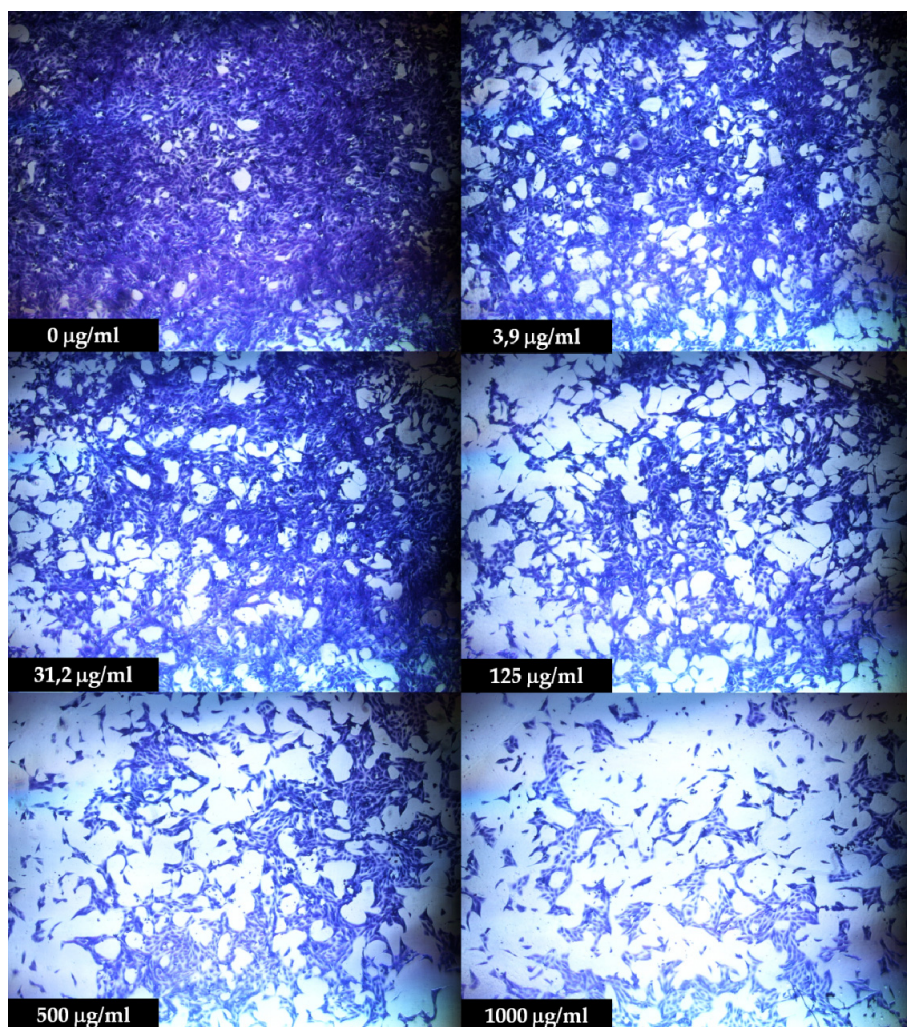


Figura V.9. Imagen al microscopio óptico de las células teñidas con cristal violeta en presencia de distintas concentraciones del copolímero poli(AB-*co*-MANSA) (60:40).

Los tres copolímeros son activos en el rango de concentraciones ensayadas pero, llamativamente, el polímero con menor cantidad de MANSA en su composición, poli(AB-*co*-MANSA) (70:30), es el que presenta una mayor actividad antimitogénica. Esto se debe a la formación

de estructuras supramoleculares (como se estudió en el capítulo anterior) debido a la presencia de dominios hidrofóbicos (AB) e hidrofílicos (MANSA) en las cadenas poliméricas.

Los estudios de Lozano y colaboradores^{15, 26-28} indicaron que la interacción entre el ANSA y los FGF tienen lugar con estequiometría 1:1, por lo que la presencia de varias unidades MANSA cercanas puede impedir estéricamente la interacción ANSA-FGF. Si nos fijamos en los resultados obtenidos en las medidas de dispersión de luz y potencial zeta (Tabla IV.4) comprobamos que el tamaño de partícula de los polímeros con menor contenido en MANSA tienen un mayor tamaño de partícula y un menor potencial zeta; esto nos indica que la concentración de unidades MANSA en la superficie de la micela es menor, sufriendo menos impedimentos estéricos a la hora de interaccionar con los aFGF.

En la Figura V.10 se muestra los resultados obtenidos para la familia poli(VP-co-MANSA).

Esta familia de copolímeros presenta menos actividad que los copolímeros con AB. El copolímero con menor cantidad de MANSA en su composición, poli(VP-co-MANSA) (80:20) sólo presenta actividad a concentraciones superiores a 250 µg/ml, mientras que el resto de copolímeros presentan actividad prácticamente en todo el rango de composiciones, siendo ésta en todos los casos dependiente con la concentración de copolímero en el medio.

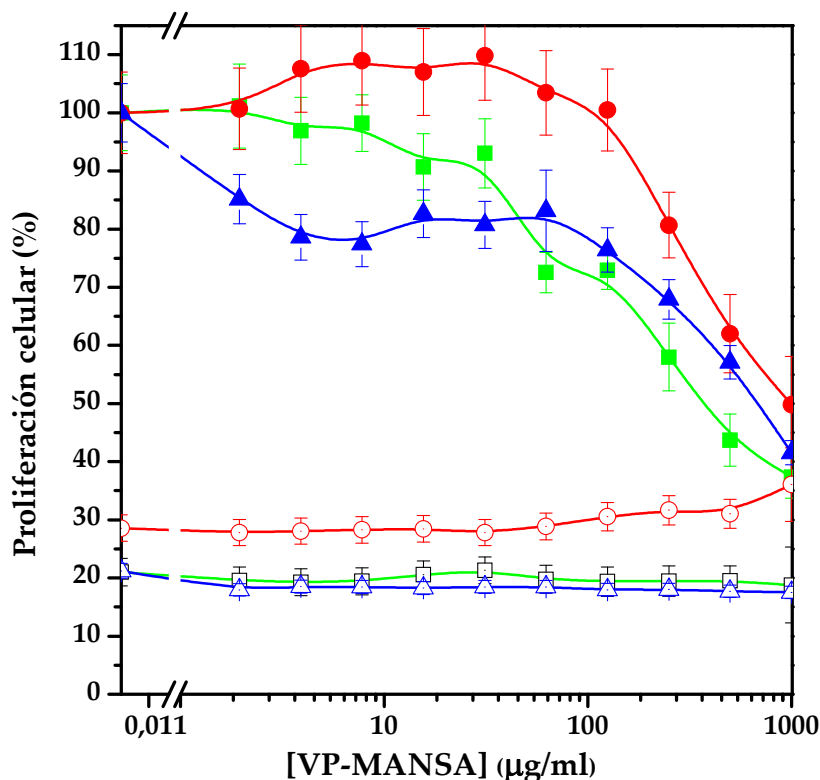


Figura V.10. Efecto de los copolímeros del sistema poli(VP-co-MANSA) en la proliferación celular de fibroblastos Balb/c 3T3. Símbolos rellenos: Ensayo de proliferación inducida por aFGF activado por heparina. Símbolo vacío: Ensayo de toxicidad. En negro poli(VP-co-MANSA) (50:50), en azul poli(VP-co-MANSA) (60:40) y en rojo poli(VP-co-MANSA) (70:30).

Al igual que en todos los casos anteriores, la presencia del polímero no tiene ningún efecto nocivo sobre las células, como se puede comprobar en los ensayos de toxicidad.

Si comparamos los resultados obtenidos con estos dos sistemas se comprueba que la formación de micelas en el caso de los copolímeros con AB facilita una orientación óptima de los grupos sulfónicos para su

interacción con los factores de crecimientos. Esto proporciona un incremento en la actividad inhibitoria de los copolímeros con AB a bajas concentraciones, mientras que en los copolímeros con VP se necesitan concentraciones mayores. Si comparamos los polímeros de MANSA y AMPS con AB observamos que el tipo de interacción entre copolímero y factor de crecimiento también influye y que el tipo de interacción de los copolímeros de MANSA es más favorable, por lo que su actividad a bajas concentraciones es mayor. Estos resultados demuestran la gran influencia de la microestructura y la morfología de los copolímeros sobre su bioactividad.

V.3.2 Estudio de las interacciones polímero-FGF y heparina-FGF

Los estudios de microcalorimetría nos van a permitir cuantificar y determinar el tipo de interacción que se tiene entre los polímeros y el factor de crecimiento. Los resultados obtenidos en los ensayos de microcalorimetría se muestran en la Tabla V.1

	K	ΔH (kcal/mol)	ΔS (kcal/mol·K)
ANSA-bFGF	$3,02 \cdot 10^4$	$-2,39 \cdot 10^4$	-78,1
Poli(AMPS)-bFGF	$1,05 \cdot 10^5$	$-1,35 \cdot 10^4$	-20,6
Poli(AB-co-AMPS) (50:50)-bFGF	$1,91 \cdot 10^4$	$-3,56 \cdot 10^4$	-99,9
Poli(VP-co-AMPS) (50:50)-bFGF	$1,12 \cdot 10^4$	$-1,31 \cdot 10^4$	-21,2
Poli(AB-co-MANSA) (60:40)-bFGF	$7,21 \cdot 10^4$	$-2,63 \cdot 10^4$	-63,9
Poli(AB-co-MANSA) (30:70)-bFGF	$9,57 \cdot 10^4$	$-9,08 \cdot 10^4$	-270,0
Poli(VP-co-MANSA) (50:50)-bFGF	$5,54 \cdot 10^4$	$-3,23 \cdot 10^4$	-29,3
Heparina-bFGF	$1,12 \cdot 10^5$	$-2,96 \cdot 10^4$	-69,9

Tabla V.1. Resultados de la titulación calorimétrica isoterma a T=37 °C.

A la vista de los resultados obtenidos cabe destacar que las interacciones que se observan entre Poli(AMPS)-bFGF y ANSA-bFGF son predominantemente electrostáticas, ya que ΔS adquiere siempre valores negativos. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Liekens y colaboradores¹⁹ y Fernández-Tornero y colaboradores¹⁵ que indicaban que las interacciones que tenían lugar entre el Poli(AMPS)-bFGF y ANSA-bFGF eran de tipo electrostático mediante la acción de los grupos sulfónicos de cada molécula. Por lo tanto los distintos copolímeros sintetizados actúan de forma análoga mediante interacciones electrostáticas de sus grupos sulfónicos.

La constante de afinidad (K) nos indica la afinidad de interacción entre las distintas moléculas en estudio y el bFGF. La heparina muestra la mayor afinidad por el bFGF debido a que biológicamente están diseñadas para interaccionar entre sí. El resto de moléculas tienen constantes de afinidad próximas a la heparina, por tanto la inhibición del bFGF es posible al ser un proceso competitivo que se favorece al aumentar la concentración de polímero. Tanto el Poli(AMPS) como el Poli(AB-co-MANSA) (30:70) son los que muestran afinidades más cercanas a la heparina y a su vez son los que han mostrado mayor actividad en la inhibición del bFGF.

Por último, destacar que todas las entalpías de asociación adquieren valores negativos. Esto implica que el proceso de interacción entra moléculas es un proceso exotérmico.

V.4 Bibliografía

- (1) Carmeliet, P. Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nature Medicine*. **2000**, 6 (4), 389-395.
- (2) Carmeliet, P., and Jain, R. K. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*. **2000**, 407 (6801), 249-257.
- (3) Folkman, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *New England Journal of Medicine*. **1971**, 285 (21), 1182-1186.
- (4) Folkman, J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *Journal of the National Cancer Institute*. **1990**, 82 (1), 4-6.
- (5) Folkman, J. Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nature Medicine*. **1995**, 1 (1), 27-31.
- (6) Azad, N.; Perroy, A.; Gardner, E.; Imamura, C. K.; Graves, C.; Sarosy, G. A.; Minasian, L.; Kotz, H.; Raggio, M.; Figg, W. D., and Kohn, E. C. A phase I study of paclitaxel and continuous daily CAI in patients with refractory solid tumors. *Cancer Biology and Therapy*. **2009**, 8 (19), 1800-1805.
- (7) Benelli, R., and Ferrari, N. Angiogenesis inhibition: State of the art, forgotten strategies and new perspectives in cancer therapy. *Current Cancer Therapy Reviews*. **2009**, 5 (3), 203-216.
- (8) Noberasco, C.; Spitaleri, G.; Mancuso, P.; Zorzino, L.; Radice, D.; Milani, A.; Rocca, A.; Bertolini, F.; Sandri, M. T.; Curigliano, G.; de Pas, T.; Jemos, C.; Omodeo Salè, E.; Boselli, S., and de Braud, F. Safety, Tolerability and Biological Effects of Long-Term Metronomic Administration of Non-Cytotoxic Anti-Angiogenic Agents. *Oncology*. **2010**, 77 (6), 358-365.
- (9) Bos, P. D.; Zhang, X. H. F.; Nadal, C.; Shu, W.; Gomis, R. R.; Nguyen, D. X.; Minn, A. J.; Van De Vijver, M. J.; Gerald, W. L.; Foekens, J. A., and Massagué, J. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature*. **2009**, 459 (7249), 1005-1009.
- (10) Chiang, A. C., and Massagué, J. Molecular basis of metastasis. *New England Journal of Medicine*. **2008**, 359 (26).
- (11) Nguyen, D. X.; Bos, P. D., and Massagué, J. Metastasis: From dissemination to organ-specific colonization. *Nature Reviews Cancer*. **2009**, 9 (4), 274-284.

- (12) Alessi, P.; Leali, D.; Camozzi, M.; Cantelmo, A.; Albini, A., and Presta, M. Anti-FGF2 approaches as a strategy to compensate resistance to anti-VEGF therapy: Long-pentraxin 3 as a novel antiangiogenic FGF2-antagonist. *European Cytokine Network*. **2009**, 20 (4), 225-234.
- (13) Leali, D.; Alessi, P.; Coltrini, D.; Rusnati, M.; Zetta, L., and Presta, M. Fibroblast growth factor-2 antagonist and antiangiogenic activity of long-pentraxin 3-derived synthetic peptides. *Current Pharmaceutical Design*. **2009**, 15 (30), 3577-3589.
- (14) Rapraeger, A. C. Requirement of heparan sulfate for bFGF-mediated fibroblast growth and myoblast differentiation. *Science*. **1991**, 252 (5013), 1705-1708.
- (15) Fernández-Tornero, C.; Lozano, R. M.; Redondo-Horcajo, M.; Gómez, A. M.; López, J. C.; Quesada, E.; Uriel, C.; Valverde, S.; Cuevas, P.; Romero, A., and Giménez-Gallego, G. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *The Journal of biological chemistry*. **2003**, 278 (24), 21774-21781.
- (16) Liekens, S.; Neyts, J.; ve, B., and De Clercq, E. The sulfonic acid polymers PAMPS [Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesuifonie acid)] and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology Research*. **1997**, 9 (4), 173-181.
- (17) Liekens, S.; Leali, D.; Neyts, J.; Esnouf, R.; Rusnati, M.; Dell'era, P.; Maudgal, P. C.; De Clercq, E., and Presta, M. Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, signaling, and mitogenic activity by heparin-mimicking polysulfonated compounds. *Molecular Pharmacology*. **1999**, 56 (1), 204-213.
- (18) Faham, S.; Hileman, R. E.; Fromm, J. R.; Linhardt, R. J., and Rees, D. C. Heparin structure and interactions with basic fibroblast growth factor. *Science*. **1996**, 271 (5252), 1116-1120.
- (19) Liekens, S.; Neyts, J.; Dégrève, B., and De Clercq, E. The sulfonic acid polymers PAMPS [Poly(2-acrylamido-2-methyl-1-propanesuifonie acid)] and related analogues are highly potent inhibitors of angiogenesis. *Oncology Research*. **1997**, 9 (4), 173-181.

- (20) Digabriele, A. D. Structure of a heparin-linked biologically active dimer of fibroblast growth factor. *Nature*. **1998**, 393 (6687), 812-817.
- (21) Velazquez-Campoy, A., and Freire, E. Isothermal titration calorimetry to determine association constants for high-affinity ligands. *Nature Protocols*. **2006**, 1 (1), 186-191.
- (22) Velázquez-Campoy, A.; Ohtaka, H.; Nezami, A.; Muzammil, S., and Freire, E. Isothermal titration calorimetry. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*. **2004**, Chapter 17.
- (23) Baker, B. M., and Murphy, K. P. Evaluation of linked protonation effects in protein binding reactions using isothermal titration calorimetry. *Biophysical Journal*. **1996**, 71 (4), 2049-2055.
- (24) Jelesarov, I., and Bosshard, H. R. Isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry as complementary tools to investigate the energetics of biomolecular recognition. *Journal of Molecular Recognition*. **1999**, 12 (1), 3-18.
- (25) Freire, E.; Schön, A., and Velazquez-Campoy, A. (2009) Methods in Enzymology, (Johnson, M. L., Holt, J. M., and Ackers, G. K., Eds.), pp 127-155.
- (26) Cuevas, P.; Carceller, F.; Reimers, D.; Cuevas, B.; Lozano, R. M., and nez-Gallego, G. Inhibition of intra-tumoral angiogenesis and glioma growth by the fibroblast growth factor inhibitor 1,3,6-naphthalenetrisulfonate. *Neurological research*. **1999**, 21 (5), 481-487.
- (27) Lozano, R. M.; Jiménez, M. A.; Santoro, J.; Rico, M., and Giménez-Gallego, G. Solution structure of acidic fibroblast growth factor bound to 1,3,6-naphthalenetrisulfonate: A minimal model for the anti-tumoral action of suramins and suradistas. *Journal of Molecular Biology*. **1998**, 281 (5), 899-915.
- (28) Pineda-Lucena, A.; Jiménez, M. A.; Lozano, R. M.; Nieto, J. L.; Santoro, J.; Rico, M., and Jiménez-Gallego, G. Three-dimensional structure of acidic fibroblast growth factor in solution: Effects of binding to a heparin functional analog. *Journal of Molecular Biology*. **1996**, 264 (1), 162-178.

VI. Desarrollo de un modelo tridimensional de angiogénesis *in vitro*

VI.1 Introducción

El estudio de la angiogénesis no sólo comprende el proceso de proliferación celular, sino que también intervienen numerosas etapas, entre las que cabe destacar: proliferación, migración y diferenciación. La importancia de estas tres etapas es tal que se han desarrollado numerosos ensayos *in vitro* para su estudio:

- Proliferación: La mayoría de estos ensayos se basan en el cultivo de células en presencia de los factores de crecimiento necesarios y/o los fármacos en estudio, determinándose la proliferación mediante recuento celular¹.
- Migración: Existen varios ensayos para la determinación de la migración celular como respuesta a un estímulo angiogénico². El ensayo más frecuente que se suele realizar es el de la cámara de quimiotaxis, consiste en sembrar las células en una cámara especial con una membrana permeable a las células que las permite migrar en respuesta a los factores proangiogénicos añadidos al medio³.
- Diferenciación: Uno de los ensayos más específicos para estudiar la angiogénesis es el estudio de la capacidad de las células endoteliales para formar estructuras tubulares⁴. En este campo, lo más utilizado son los cocultivos de células endoteliales y fibroblastos, que en determinadas condiciones son capaces de formar estructuras tubulares que pueden ser analizadas mediante microscopía⁵⁻⁶.

Este tipo de ensayos se realizan normalmente en placas de cultivo de poliestireno, por lo que las condiciones difieren considerablemente de cualquier situación real. La búsqueda de modelos que reproduzcan mejor la realidad ha llevado al desarrollo de ensayos tridimensionales *in vitro* que se asemejen a las características del tejido humano para crear microambientes que reproduzcan, en la medida de lo posible, las condiciones *in vivo* necesarias para que las células endoteliales formen estructuras capilares⁶⁻⁷. La composición, la arquitectura y el grado de entrecruzamiento de estos sistemas se deben asemejar a las propiedades de la matriz extracelular (ECM) y, por lo tanto, se debe controlar qué tipo de fuerzas mecánicas son transmitidas a las células. La composición de la ECM también controla la adhesión celular y la migración mediante la presencia de enzimas proteolíticas que determinan la capacidad de la célula para remodelar la matriz y permitir su migración a través de ella⁸.

Por lo tanto, la sustitución de ensayos *in vitro* 2D por ensayos *in vitro* 3D está limitada por la disponibilidad de sustratos que tengan características semejantes a la ECM y permitan, por tanto, la proliferación, migración y diferenciación celular⁹. Actualmente existen diferentes tipos de sustratos que son utilizados como ECM en el estudio de la angiogénesis con diferentes características, como son: Matrigel®, colágeno, fibrina, PuraCol®, Extracel®, etc.

VI.1.2 Características de las ECMs sintéticas

El uso de un sustrato u otro en los ensayos tridimensionales de angiogénesis *in vitro* depende de multitud de parámetros: consistencia, disponibilidad, tiempos de coagulación, precio,... y elegir uno u otro dependerá de las características que busquemos.

Matrices comerciales como PuraCol® (99,9% colágeno tipo I) o PuraMatrix® (péptidos sintéticos autoensamblados) se han utilizado como matrices para el cultivo celular, el problema que presentan es que poseen un elevado tiempo de coagulación y un elevado tiempo de manipulación, lo que hace difícil su aplicación en ensayos 3D¹⁰. Otras matrices comerciales sintéticas como Extracel® (hidrogel sintético) suelen tener mejores propiedades con respecto a las matrices de origen natural, pero sus precios son más elevados.

Dentro de las matrices naturales, el Matrigel® es una de las más utilizadas. Se prepara a partir de una mezcla gelatinosa de proteínas, glicoproteínas y factores de crecimientos que se obtiene de las secreciones de tumores tipo Engelbreth-Holm-Swarm⁷. Este tipo de matriz favorece la proliferación, migración y diferenciación celular, pero al no tener una composición bien definida ni constante de factores de crecimiento hace que la respuesta sea diferente en cada matriz¹¹⁻¹².

También se suelen utilizar productos naturales como la fibrina para la preparación de matrices en ensayos tridimensionales. Este tipo de compuestos reproducen adecuadamente el medio necesario para el proceso de neovascularización de una forma simple y sencilla^{10, 13}. Al

mismo tiempo, hay estudios que demuestran que la red de vasos sanguíneos que se generan asociados a un tumor se desarrolla en una matriz de fibrina que les sirve de soporte y que se forma en los alrededores del tumor¹⁴⁻¹⁵. La adicción de diferentes factores de crecimiento, como son los FGF y VEGF, permite la simulación de una matriz para el estudio de los procesos de angiogénesis tumorales¹⁶⁻¹⁷.

En el presente trabajo, se han empleado soportes de fibrina (sintetizados a partir de la coagulación de una disolución de fibrinógeno con trombina) para el estudio de la inhibición de la formación de estructuras tipo capilares. Se ha elegido este método debido a su mayor reproducibilidad y menor coste. Además, este sistema nos permite la adición de diferentes moléculas en disolución antes de la coagulación del sistema, consiguiéndose de esta forma una matriz homogénea y de composición controlada.

VI.1.3 Inmunohistoquímica

La inmunohistoquímica se basa en la utilización de anticuerpos, previamente marcados, para la detección de moléculas específicas, principalmente proteínas, tejidos y células aisladas. Esta técnica nos permite, no sólo determinar si una molécula específica está presente o no en una región determinada, sino también proporcionar información precisa sobre su estructura, actividad, etc¹⁸.

Los anticuerpos son una serie de proteínas de la familia de las inmunoglobulinas que son sintetizadas en respuesta a una sustancia ajena. Según su procedencia se puede distinguir entre¹⁹:

- Monoclonales: Se preparan en laboratorio a partir de líneas celulares sencillas que producen el anticuerpo. Son altamente específicos.
- Policlonales: Se producen en animales (ovejas, conejos y cabras) como respuesta al ser expuestos a un antígeno específico, obteniéndose un antisuero con distintos tipos de anticuerpos.

Posteriormente, se modifican incorporándoles un marcador para que puedan ser detectados. Los marcadores pueden ser: isótopos radioactivos, enzimas, partículas fluorescentes o sustancias quimioluminiscentes.

Inmunofluorescencia

La inmunofluorescencia es una técnica que emplea anticuerpos conjugados a fluorocromos. Los fluorocromos son moléculas que al ser excitadas con una determinada longitud de onda son capaces de emitir energía de una longitud de onda mayor. En este tipo de marcaje se puede hablar de dos tipos de estrategias a seguir: el método directo o el indirecto²⁰:

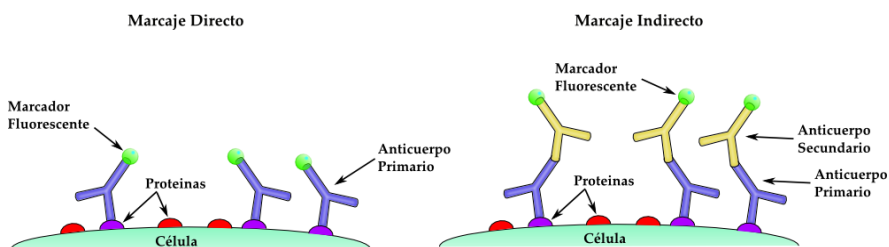


Figura VI.1. Esquema de los distintos métodos de marcaje utilizados en una inmunofluorescencia.

- ✓ Método directo: Los métodos directos consisten en que el anticuerpo (anticuerpo primario) se encuentre asociado con algún tipo de marcador que permita identificar los lugares donde se ha unido. Tiene como ventaja que sobre una misma preparación se pueden incubar tantos anticuerpos como se desee, o tantos como sistemas de marcaje diferentes podamos emplear. En el caso de la inmunofluorescencia el límite de marcadores simultáneos estará fijado por el número de fluorocromos que seamos capaces de detectar.
- ✓ Método indirecto: Se basan en la aplicación de un anticuerpo primario sobre el tejido, que se une a la proteína que buscamos para posteriormente aplicar un segundo anticuerpo (anticuerpo secundario) unido a un marcador fluorescente y que reconoce al anticuerpo primario uniéndose a él. Estos métodos son mucho más sensibles que los directos, pues al anticuerpo primario se pueden unir más de un anticuerpo secundario, incrementando la señal. Otra ventaja de estos métodos es que el marcaje del anticuerpo secundario es más fácil, ya que suelen ser anticuerpos policlonales que se obtienen en gran cantidad. El límite en el número de antígenos que es posible detectar se encuentra en el número de anticuerpos secundarios distintos de que se disponen acomplexados con marcadores diferentes.

El objetivo de este capítulo es el estudio del efecto de los polímeros sintetizados en un modelo tridimensional de angiogénesis *in vitro*. Dicho modelo se basa en la formación de estructuras tipo capilar en

matrices fibrina que simulan las propiedades de la ECM y en las que se pueden añadir distintos elementos reguladores de la angiogénesis (bFGF y/o VEGF). El estudio del proceso de angiogénesis *in vitro* se ha realizado mediante un proceso de inmunotinción de las distintas estructuras celulares formadas y su posterior visualización mediante microscopía láser confocal.

VI.2 Materiales y métodos

VI.2.1 Cultivos celulares

Para la realización de los ensayos tridimensionales de angiogénesis *in vitro* se han utilizado células endoteliales de cordón umbilical humano (HUVEC) aisladas en los laboratorios del Instituto de Patología del Johannes Gutenberg-Universität Mainz (Alemania) mediante técnicas previamente establecidas²¹. El cultivo rutinario de estas células se ha llevado a cabo en frascos de cultivo recubiertos de gelatina utilizando medio de cultivo M199 (Sigma-Aldrich) suplementado con 20% de suero fetal bovino (FBS, Life Technologies), 1% de penicilina/estreptomicina, 1% Glutamax I (Life Technologies), 25 µg/ml de heparina sódica (Sigma-Aldrich) y 25 µg/ml de suplemento de crecimiento para células endoteliales (Becton Dickinson).

VI.2.2 Preparación de matrices tridimensionales de fibrina

Este ensayo se basa en el principio de que las células endoteliales pueden formar estructuras similares a vasos sanguíneos cuando son

estimuladas con los factores proangiogénicos específicos y son cultivadas en una matriz soporte adecuada⁶.

Para la síntesis de la ECM se ha utilizado fibrinógeno de suero humano (Fluka) disuelto en una disolución estéril de tampón fosfato (PBS, Gibco) a una concentración de 6 mg/mL. 500 μ L de esta disolución se mezclan con 450 μ L de células (250000 células/mL) en medio M199 y se le añaden 200 U/mL de Aprotinina (Sigma-Aldrich) para prevenir la fibrinólisis de la ECM. Esta suspensión de células se transfiere a una placa de cultivo de 48 pocillos (475 μ L/pocillo) y se induce la coagulación del fibrinógeno mediante la adición de 25 μ L de trombina (Sigma-Aldrich) agitando vigorosamente e incubando 5 minutos a 37 °C.

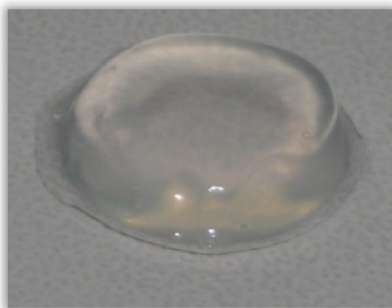


Figura VI.2. Aspecto de una ECM de fibrina extraída de la placa de cultivo.

Una vez se ha formado el gel, se le añaden 500 μ L por pocillo de medio M199 completo, al cual se le añaden los factores de crecimiento VEGF (Sigma-Aldrich) y bFGF (Sigma-Aldrich) y los polímeros en estudio en las concentraciones que se indican en la Tabla VI.1.

VEGF	bFGF	Polímero
50 ng/mL	-	1 mg/ml
-	10 ng/mL	1 mg/ml
50 ng/mL	10 ng/mL	1 mg/ml
50 ng/mL	-	0,5 mg/ml
-	10 ng/mL	0,5 mg/ml
50 ng/mL	10 ng/mL	0,5 mg/ml
50 ng/mL	-	-
-	10 ng/mL	-
50 ng/mL	10 ng/mL	-

Tabla VI.1. Concentraciones de factores de crecimientos y polímeros en los distintos ensayos 3D realizados.

VI.2.3 Visualización del proceso de angiogenesis *in vitro* mediante tinción fluorescente e inmunofluorescencia.

Después de siete días de incubación las células se fijaron sumergiendo la matriz de fibrina en una disolución de paraformaldehído durante cinco minutos. A continuación se procedió al proceso de tinción e inmunotinción de las células siguiendo los siguientes pasos (Figura VI.3):

- ✓ Permeabilización de la membrana celular con un detergente: Las muestras se introducen en PBS con un 0,05% Tritón X-100. Se incuban durante 20 minutos a 37 °C.
- ✓ Bloqueo de las proteínas: Este paso es esencial para no perder las proteínas que queremos detectar mediante la inmunotinción. En este proceso se lavan las muestras con PBS y se les añade una di-

VI. Desarrollo de un modelo tridimensional de angiogenesis *in vitro*

solución de suero de albúmina bovina (BSA, Sigma-Aldrich) al 1% en PBS.

- ✓ Adición del anticuerpo primario: Como anticuerpo primario se ha utilizado un anticuerpo de ratón que se une a las proteínas de unión entre células endoteliales (mouse anti-human PECAM CD31, DAKO), indicándonos que existe una interacción entre las células. Para esto se han sumergido las muestras en una disolución 1:50 del anticuerpo en PBS con un 1% BSA y 0,1% de Tween 20 (Sigma-Aldrich) y se ha dejado incubando a 37 °C durante siete horas.

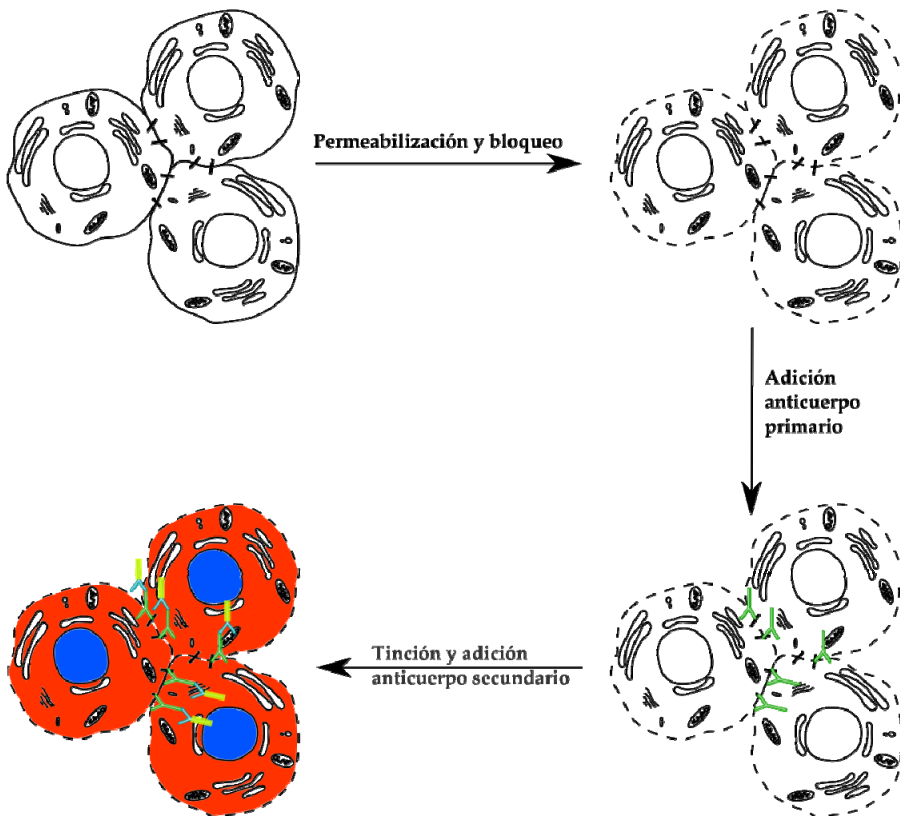


Figura VI.3. Proceso de tinción e inmunotinción.

- ✓ Tinción y adición del anticuerpo secundario: Como anticuerpo secundario se ha utilizado un anticuerpo de cabra que se une al anticuerpo de ratón y que está unido a un colorante fluorescente (goat anti-mouse-Alexa 488) que da color verde. Como tintes fluorescentes se han utilizado Hoechst 33342 (Sigma) que es un producto basado en benzimidazoles que se une al ADN del núcleo confiriéndole color azul. El otro tinte utilizado es la faloidina-TRITC (Sigma) que es un producto derivado de la amanita faloida que se une a la actina del citoplasma celular otorgándole color rojo, lo que permite estudiar la organización del citoesqueleto. Tras lavar las muestras, éstas se sumergen en una disolución 1% de BSA en PBS a la que se añaden 1:100 de faloidina-TRITC, 1:1000 de Hoechst y 1:1000 Alexa 488, dejándose incubar a temperatura ambiente durante cuatro horas.



Figura VI.4. Microscopio confocal (Leica TCS SP2) utilizado en el análisis de las muestras del ensayo tridimensional.

Tras este proceso se lavan las muestras tres veces con una disolución 0,1% de Tween 20 durante 10 minutos para eliminar los restos de la tinción que no se hayan quedado unidos y se pasa a su estudio mediante microscopía láser confocal (Figura VI.4). Esta técnica consiste en excitar las muestras mediante un láser a la longitud de onda adecuada para cada tinción (Hoechst 33342: 350 nm, TRITC: 612 nm, Alexa488 495 nm).

Para el análisis por microscopía láser confocal se monta la muestra sobre un portaobjetos con medio de montaje Fluoromount-G (SouthernBiotech) y se toman cinco imágenes aleatorias por muestra con una profundidad de 50 μm . El análisis de las imágenes se ha llevado a cabo con el software libre *ImageJ 1.42q* que se encuentra disponible la página web del Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los análisis se realizaron utilizando el plugin *analyze-measure RGB*, para obtener los porcentajes de núcleos o actina en la imagen.

VI.3 Resultados y discusión

VI.3.1 Formación de estructuras tridimensionales

En estos ensayos se utilizaron células HUVEC a pesar de que la formación de vasos sanguíneos *in vivo* se produce en la microvasculatura. Lafleur y colaboradores²² han demostrado que las células endoteliales macrovasculares también pueden alcanzar un fenotipo angiogénico si se dan las condiciones apropiadas de crecimiento. De hecho, las célu-

las endoteliales macrovasculares (HUVEC) y microvasculares (HDECm) se comportaron de manera similar en términos de la formación del tubo en geles de fibrina. En el ensayo realizado, las células se encuentran embebidas homogéneamente dentro del gel de fibrina (Figura VI.5 - 0 días) y son suplementadas con VEGF y bFGF. Bajo estas condiciones se activa el fenotipo angiogénico de las células endoteliales, lo que permite la proliferación, migración, agregación y formación de estructuras similares a los capilares (Figura VI.5 - 7 días).

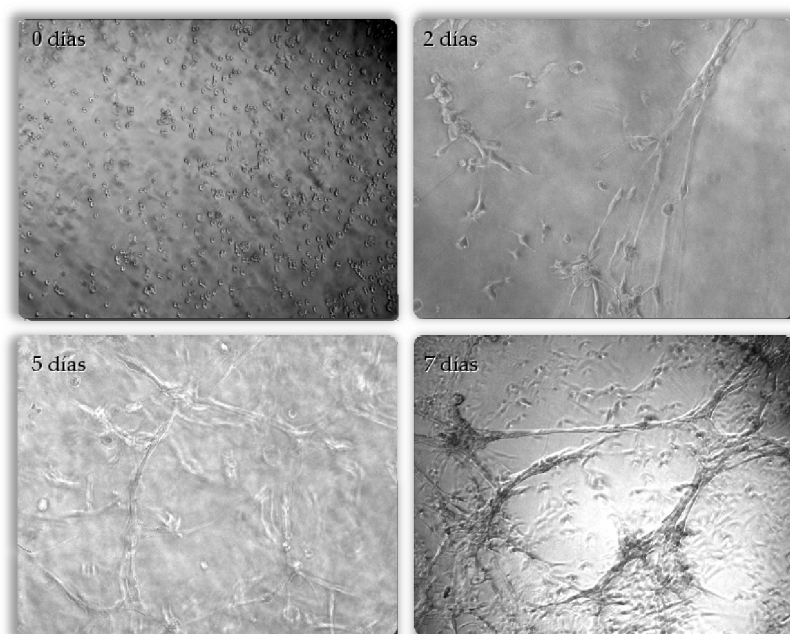


Figura VI.5. Imágenes de microscopía invertida de los geles de fibrina a disitntos tiempos.

El estudio de estas estructuras se ha realizado mediante tinción e inmunotinción para su estudio por microscopía láser confocal. Así, se observaron los núcleos en azul (Figura VI.6. a), la actina del citoesquele-

to en rojo (Figura VI.6. b), y las proteínas de adhesión entre células en verde (Figura VI.6. c). Como se observa en las Figura VI.6. (d) y Figura VI.7, las células endoteliales adquieren una conformación similar a vasos sanguíneos. Para alcanzar este tipo de conformación las células han tenido que migrar y alinearse para conseguir formar este tipo de estructuras. Se observa como la actina (rojo) se orienta de forma paralela al eje longitudinal del capilar y que las células endoteliales están en contacto íntimo entre ellas, ya que se expresa la proteína CD31 (verde).

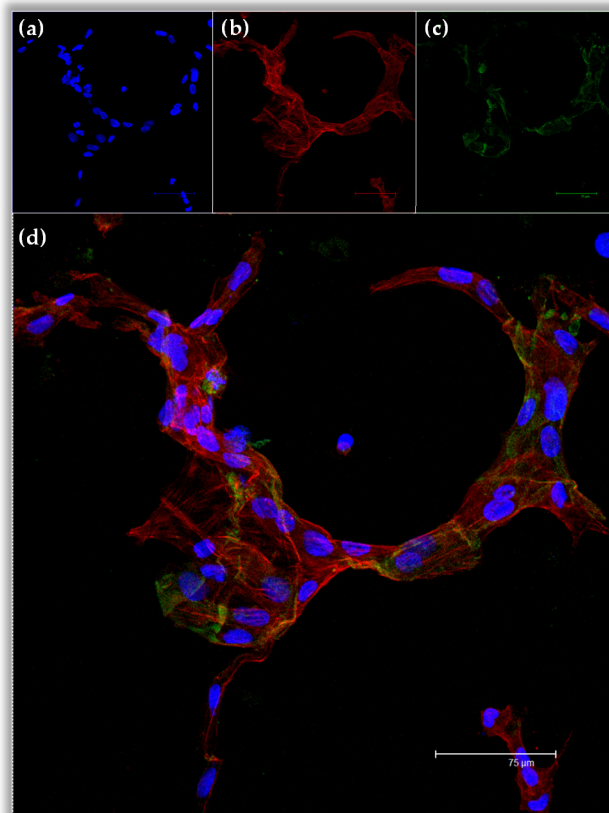


Figura VI.6. Imágenes de microscopía láser confocal. Imagen de la emisión azul - células (a), rojo - citoesqueleto (b), verde - adhesión (c) y montaje de un corte de 300 μm (d).

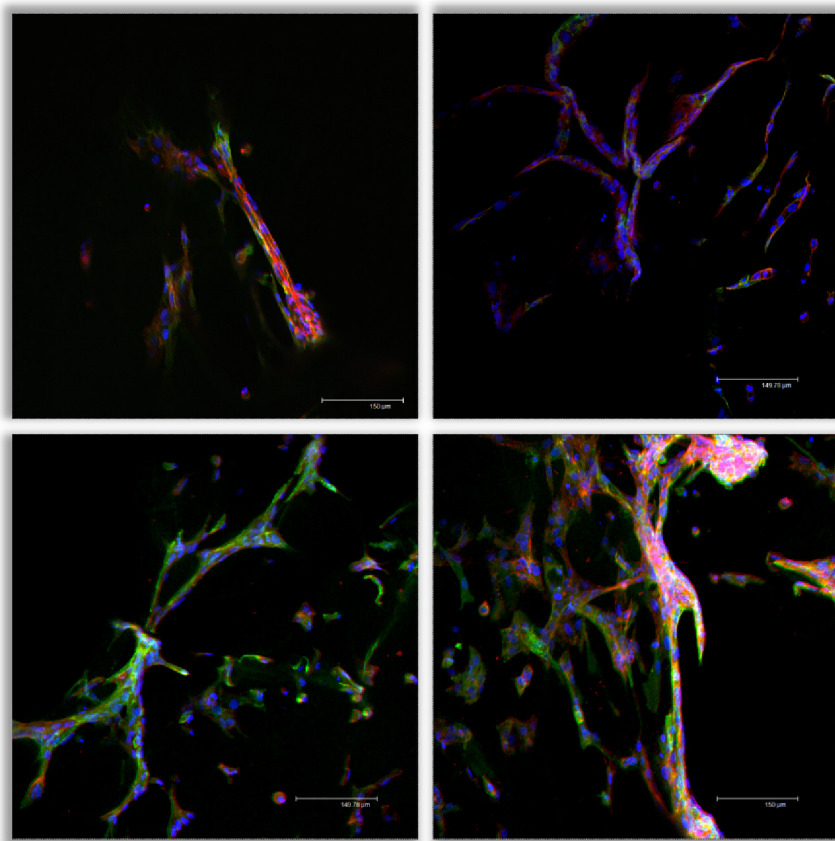


Figura VI.7. Imágenes de microscopía láser confocal de estructuras tubulares similares a vasos sanguíneos formadas en el ensayo tridimensional de angiogénesis *in vitro*.

Si se analizan estas imágenes con detalle y se realizan cortes a distintas alturas se observa que efectivamente la disposición que adquieren las células es de forma tubular, formándose posiblemente un lumen continuo dentro de esta estructura (Figura VI.8). Por lo tanto, este tipo de ensayo constituye una vía rápida de estudiar el proceso de angiogénesis *in vitro* en unas condiciones que se aproximan considerablemente a las condiciones reales.

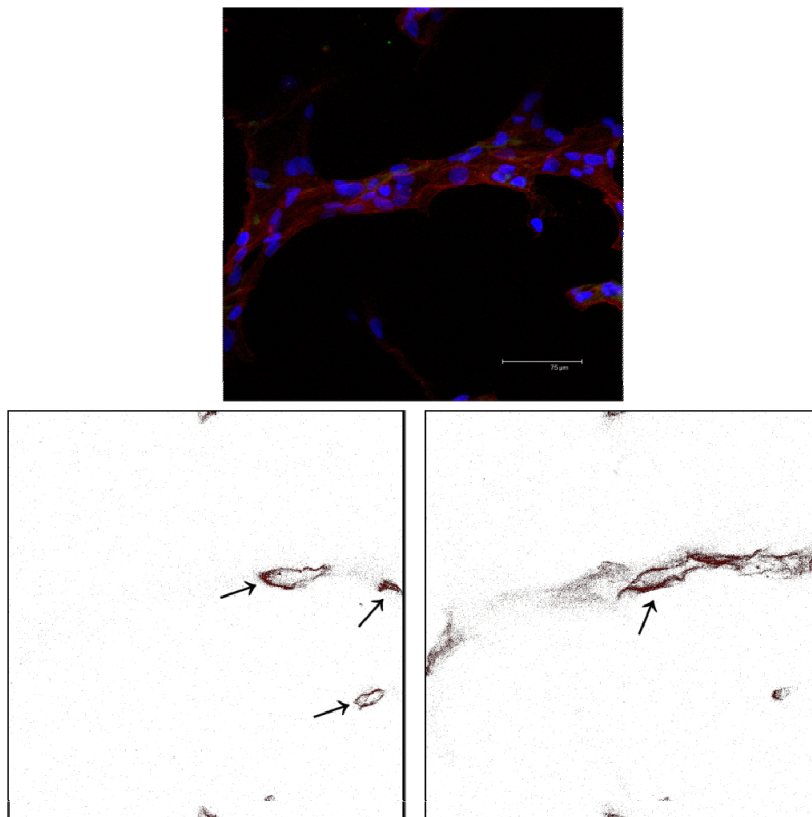


Figura VI.8. Secciones del sistema 3D obtenidas mediante microscopia láser confocal en donde se observa la formación de estructuras tubulares (flechas).

VI.3.2 Inhibición de la proliferación celular debida a la presencia de bFGF y/o VEGF en ensayos tridimensionales.

Para estudiar el efecto de los polímeros sintetizados se han añadido al medio en concentraciones de 0,5 y 1 mg/ml (excepto el sistema poli(VP-co-AMPS) que no se ha estudiado por no presentar actividad en los ensayos biológicos 2D (capítulo anterior).

Poli(AB-co-AMPS)

Esta familia de copolímeros ha demostrado su capacidad de inhibir la actividad de los aFGF en los ensayos realizados en el capítulo anterior. En la Figura VI.9 se muestran diferentes imágenes de microscopía confocal de la tinción con Hoescht de los núcleos celulares en los ensayos 3D. Se observa una reducción en el número de células cuando añadimos los polímeros.

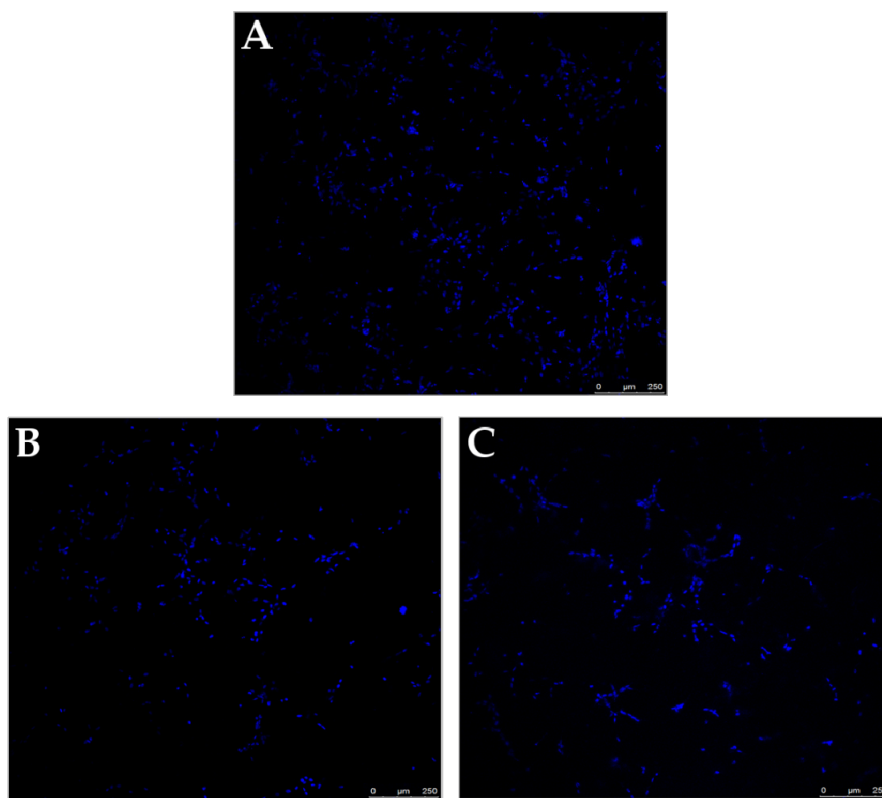


Figura VI.9. Imágenes de microscopía confocal a 10x de los núcleos de células HUVEC en los soportes de fibrina con diferentes concentraciones de poli(AB-co-AMPS) (50:50). A: 0 mg/ml, B: 0,5 mg/ml y C: 1 mg/ml.

VI. Desarrollo de un modelo tridimensional de angiogenesis *in vitro*

En la Figura VI.10 se muestran los resultados cualitativos del análisis de las imágenes de microscopía confocal:

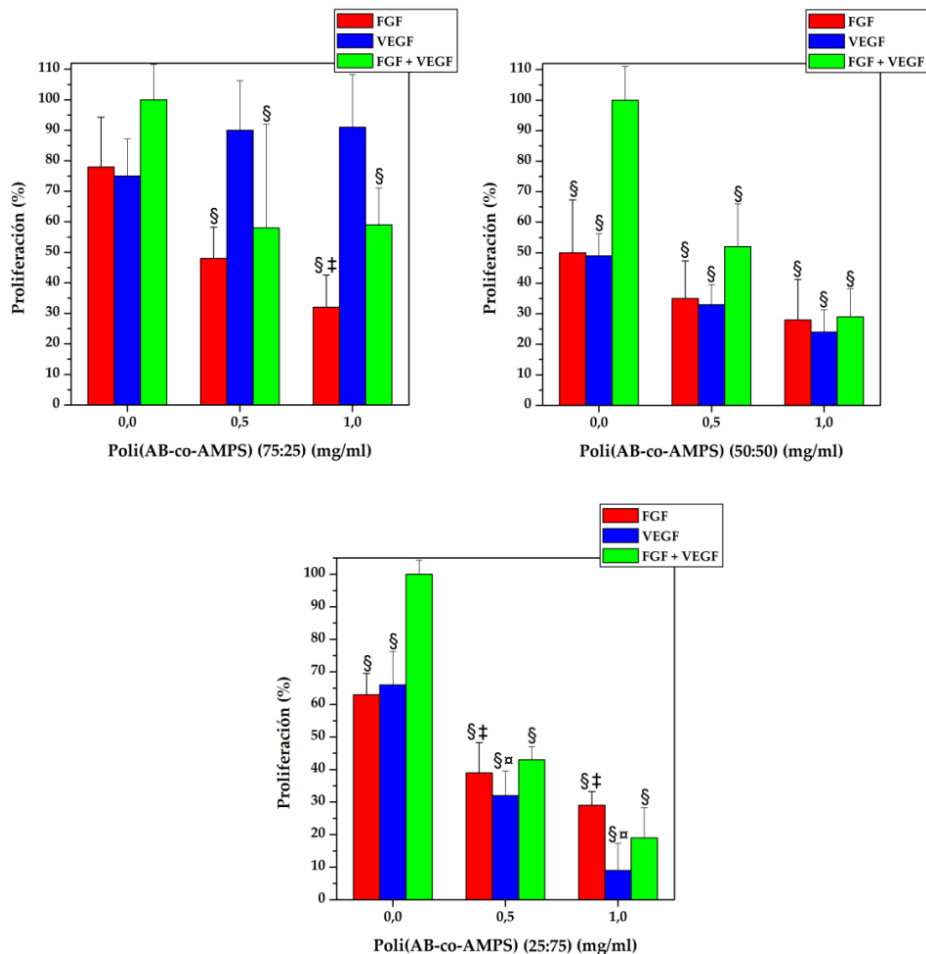


Figura VI.10. Efecto de los polímeros basados en AMPS sobre la proliferación de células HUVEC en ensayos 3D al añadir bFGF y VEGF. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre cada polímero respecto a bFGF+VEGF (§), VEGF (¶) y bFGF (‡).

Todos los copolímeros muestran una inhibición significativa cuando ambos factores de crecimiento se añaden, mientras que la inhibición no es significativa cuando sólo uno de los factores de crecimiento está presente, con excepción del copolímero (75:25) que presenta la mayor actividad frente al VEGF y al bFGF.

Poli(AB-co-MANSA)

En la Figura VI.11 se muestran diferentes imágenes de microscopía confocal de la tinción con Hoescht de los núcleos celulares en los ensayos 3D:

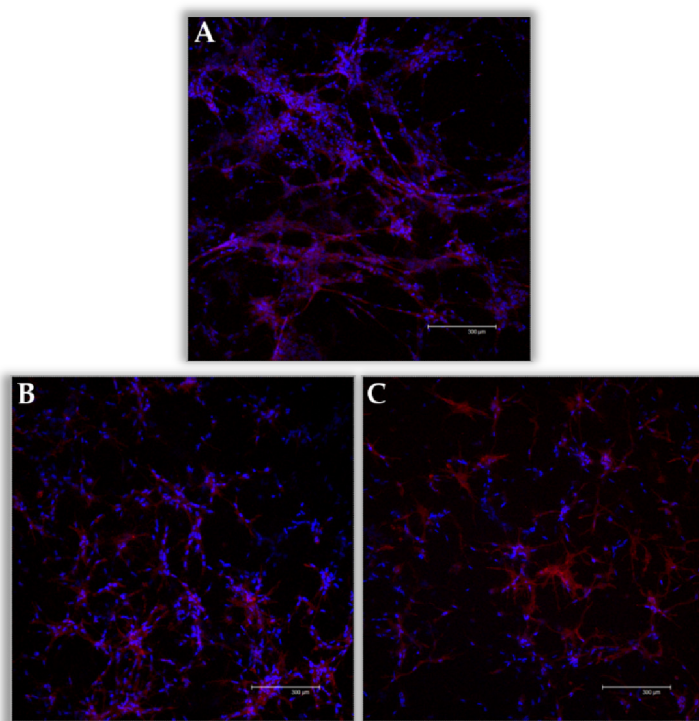


Figura VI.11. Imágenes de microscopía confocal a 10x de los núcleos de células HUVEC en los soportes de fibrina con diferentes concentraciones de poli(AB-co-MANSA) (60:40). A: 0 mg/ml, B: 0,5 mg/ml y C: 1 mg/ml.

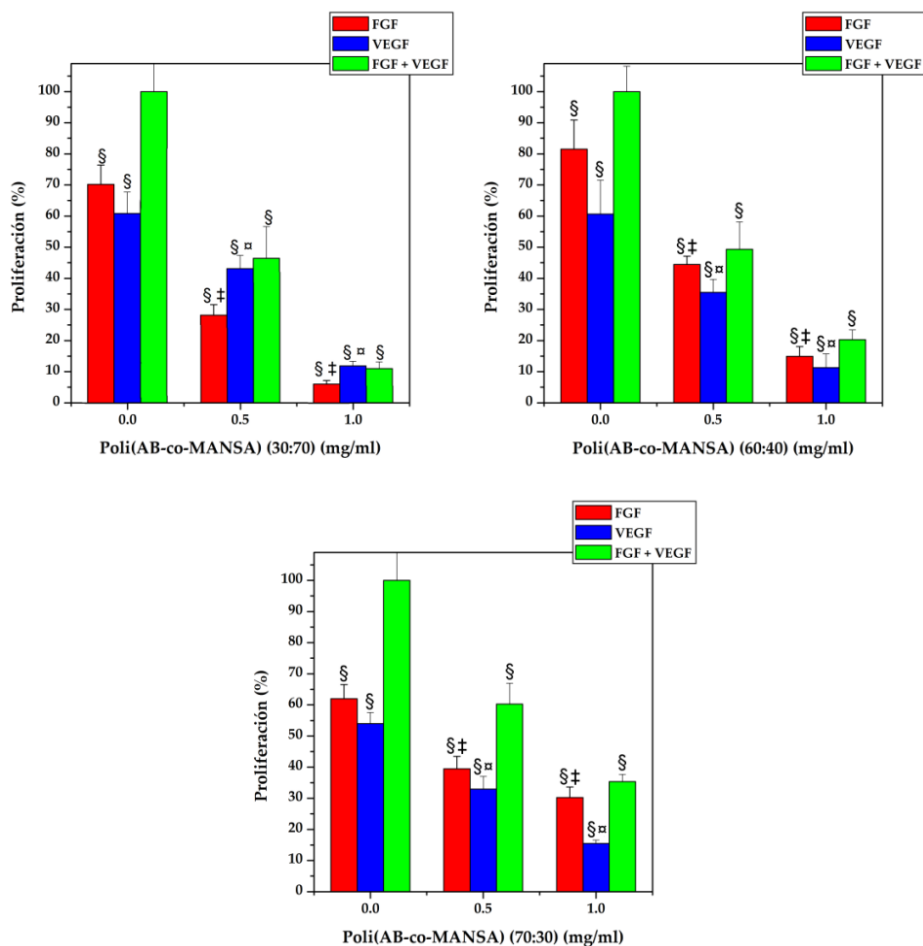


Figura VI.12. Efecto de los polímeros de la familia poli(AB-co-MANSA) sobre la proliferación de células HUVEC en ensayos 3D al añadir bFGF y VEGF. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre cada polímero respecto a bFGF+VEGF (§), VEGF (⌘) y bFGF (‡).

En las imágenes se observa una reducción significativa en el número de células cuando añadimos los polímeros. En la Figura VI.12

se muestran los resultados del análisis de las imágenes de microscopía confocal:

Todos los polímeros muestran una inhibición significativa tanto del bFGF, como del VEGF y del efecto sinérgico de ambos, por lo que se observa una clara inhibición de la proliferación celular, que aumenta proporcionalmente con la concentración de MANSA en el copolímero.

Poli(VP-co-MANSA)

Al igual que en los casos anteriores, se observa una disminución de la proliferación celular (Figura VI.13 y Figura VI.14):

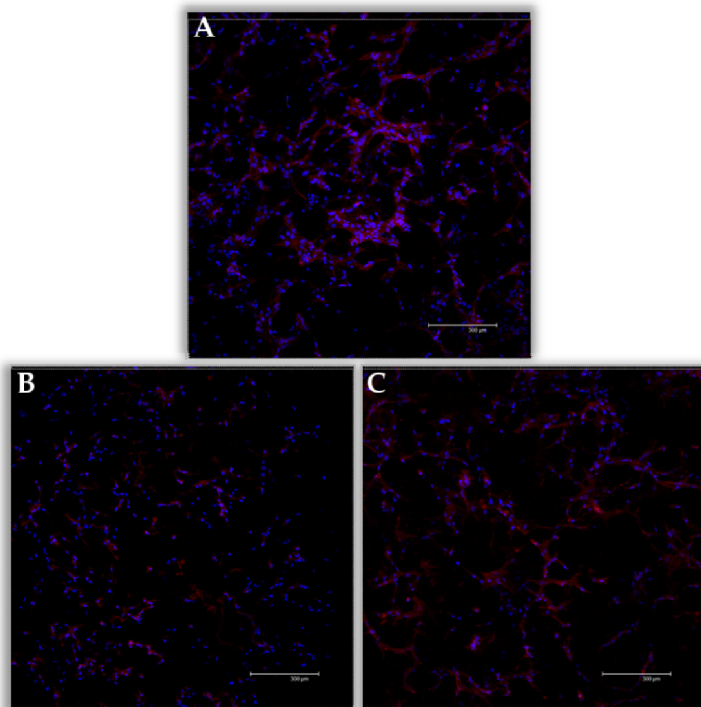


Figura VI.13. Imágenes de microscopía confocal a 10x de los núcleos de células HUVEC en los soportes de fibrina con diferentes concentraciones de poli(AB-co-MANSA) (70:30). A: 0 mg/ml, B: 0,5 mg/ml y C: 1 mg/ml.

Todos los polímeros muestran una inhibición significativa del bFGF, mientras que sólo los copolímeros con mayor cantidad de MAN-SA muestran una inhibición significativa del VEGF, lo que se refleja en los resultados con ambos factores proangiogénicos.

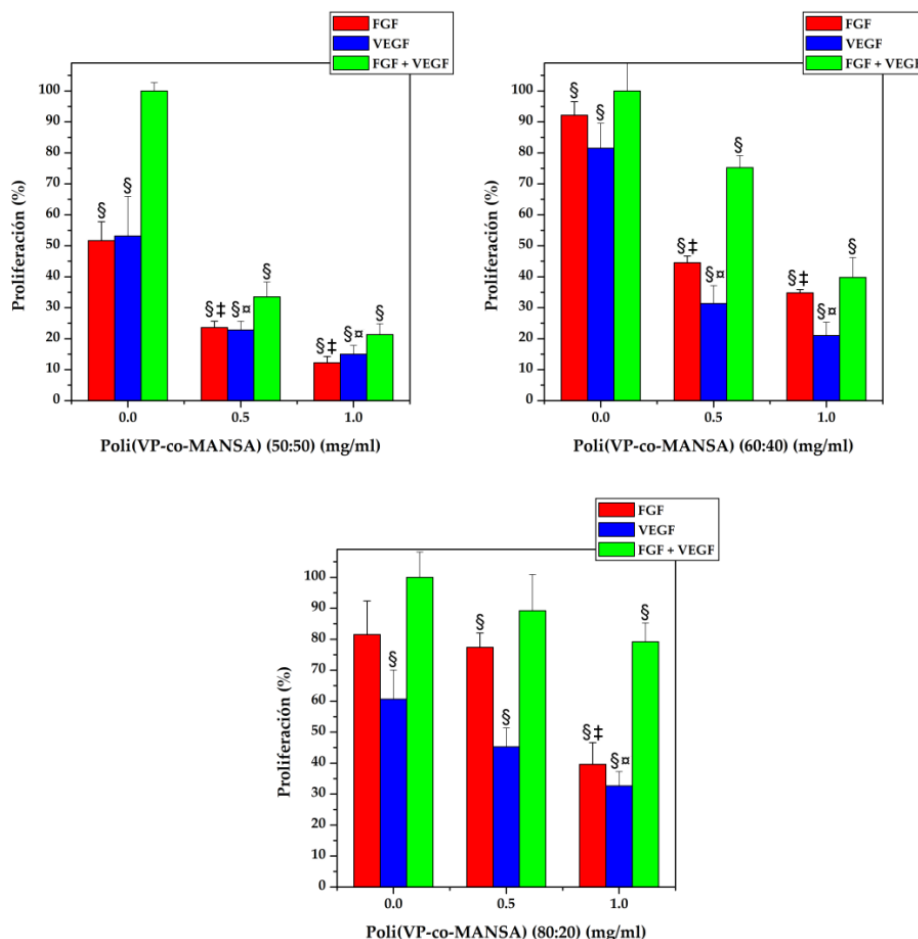


Figura VI.14. Efecto de los polímeros de la familia poli(VP-co-MANSA) sobre la proliferación de células HUVEC en ensayos 3D al añadir bFGF y VEGF. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre cada polímero respecto a bFGF+VEGF (§), VEGF (¶) y bFGF (‡).

Al igual que sucedió en los ensayos 2D de inhibición de la mitogénesis inducida por aFGF se ha observado una mayor actividad en los copolímeros de AB debido a la formación de estructuras supramoleculares (micelas que permiten una mejor orientación de los grupos naptalensulfónico para su interacción con los distintos factores de crecimiento).

Además los sistemas basados en el MANSA también muestran inhibición del VEGF, otro de los principales factores proangiogénicos dependientes de la heparina.

VI.3.3 Organización celular en las matrices 3D de fibrina.

En los ensayos 3D no sólo se estudia la proliferación celular; también se puede observar la migración celular y la asociación de las células en estructuras organizadas similares a vasos sanguíneos.

En la Figura VI. 15 se muestra el efecto de los copolímeros basados en AMPS sobre el desarrollo celular. Las figuras VI.15a y VI.15b ilustran claramente el efecto de los polímeros basados en AMPS sobre la migración y proliferación celular. En el control (Figura 10a) se observa como las células migran y se disponen alineadas para formar estructuras ramificadas con longitudes superiores a 300 μm . Cuando se añade el polímero se inhibe el contacto entre células y se observa un menor número de ramificaciones y de un tamaño menor. Si se analizan las imágenes con un mayor aumento (figuras VI.15c y VI.15d) se puede comprobar que la presencia del copolímero inhibe los factores proangiogénicos mostrando las células endoteliales una estructura celular

normal y ausencia de PECAM-CD31, lo que indica que no existen interacciones entre las células.

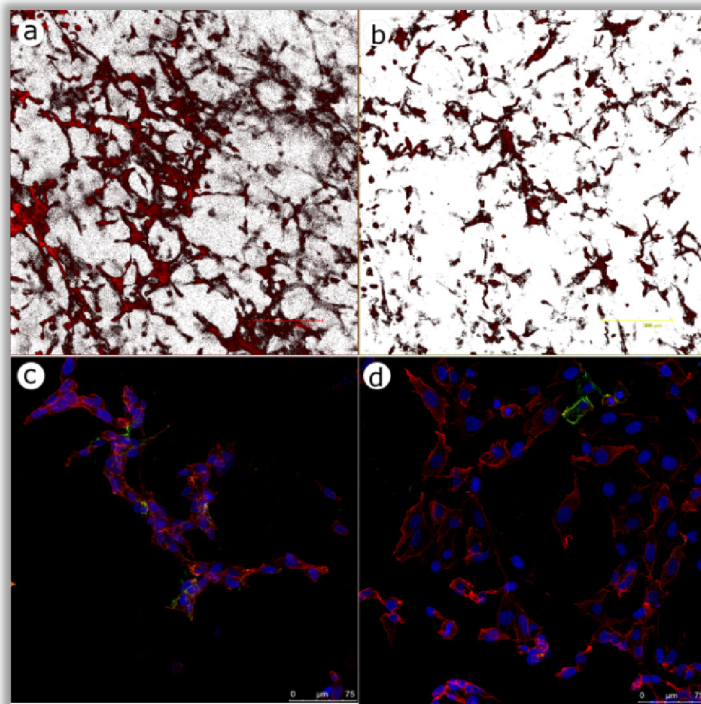


Figura VI.15. Imágenes de microscopía confocal de células endoteliales en cultivo 3D-bFGF-VEGF. (a) Control 10x. (b) Se ha añadido 1 mg/ml de poli(AB-co-AMPS) (50:50). (c) Control 40x (d) 1 mg/ml de poli(AB-co-AMPS) (50:50) a 40x.

Algo similar ocurre en el caso de los copolímeros basados en MANSA (Figura VI. 16). La Figura VI.16.a1 y VI.16.b1 muestra la distribución de actina en la matriz de fibrina en ausencia de copolímeros. Se observa como el citoesqueleto de las células se extiende y éstas se alinean para formar estructuras ramificadas que se asemejan a una red de vasos sanguíneos. Cuando se añaden los distintos copolímeros (Figura

VI.16.a3 y VI.16.b3) se impide la organización celular dependiendo de la concentración de éstos en el medio. Este efecto se da de forma más acusada en el caso de los copolímeros de AB que en los de VP, alcanzándose una mayor inhibición cuando se añaden sólo 0,5 mg/ml de copolímero (Figura VI.16b2). En el caso de los copolímeros con VP una concentración de 0,5 mg/ml (Figura VI.16a1) provoca una disminución de la formación de estructuras capilares no tan acusada como en el caso del AB, pero que a concentraciones mayores (1 mg/ml) es prácticamente idéntica (Figura VI.16c1).

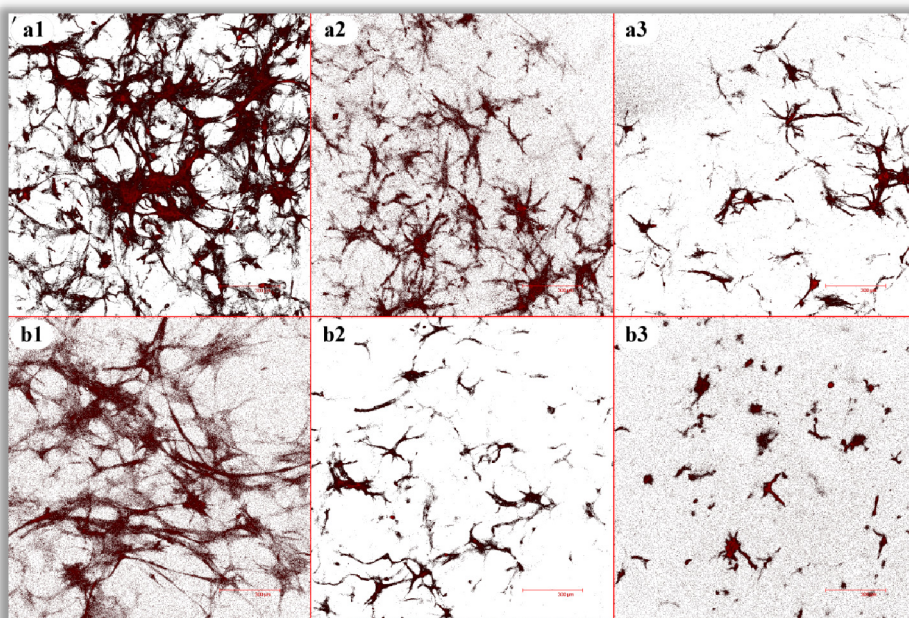


Figura VI.16. Imagen de microscopía confocal a 10x mostrando el canal rojo. (a) Poli(VP-co-MANSA) (23% MANSA). (b) Poli(AB-co-MANSA) (20% MANSA). (1) Control. (2) 0,5 mg/ml. (3) 1 mg/ml.

Este efecto de inhibición de la formación de estructuras capilares se confirma con las imágenes a mayor detalle de los cultivos tridimensionales (Figura VI.17).

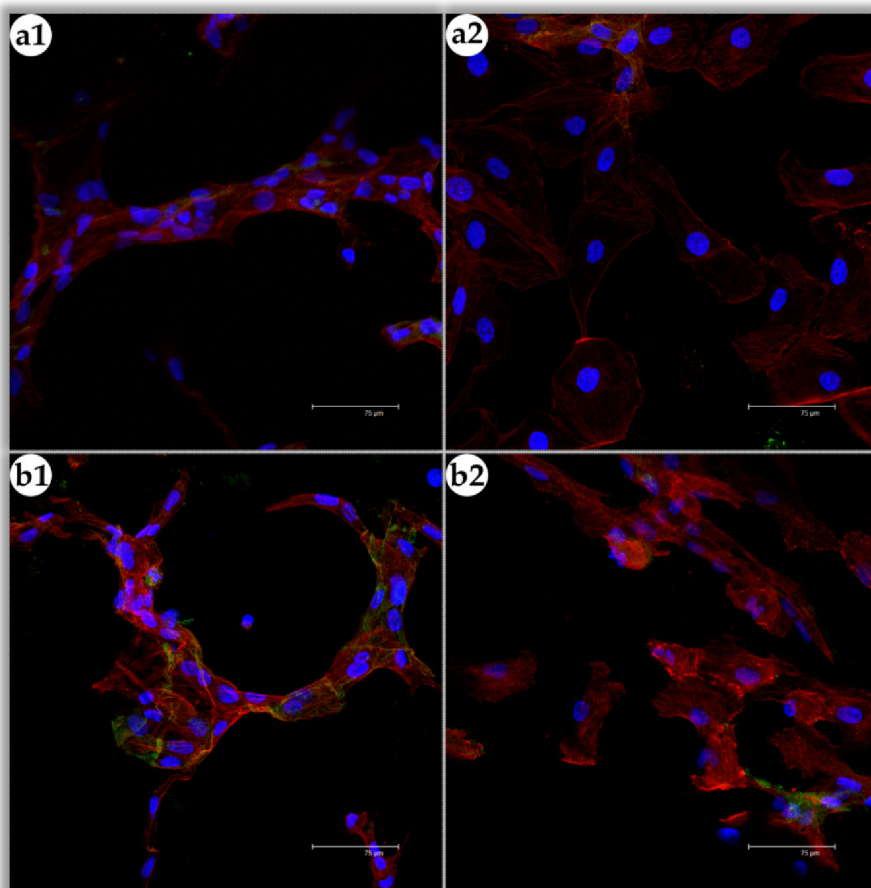


Figura VI.17. Imágenes de microscopía confocal a 40x de la formación de estructuras similares a vasos sanguíneos y su inhibición por parte de copolímeros portadores de MANSA.

Se observa cómo, en ausencia de copolímeros, las células adquieren una configuración tubular similar a vasos sanguíneos, expresando la glicoproteína de adhesión PECAM CD31 (verde) lo que nos

indica que las células se encuentran interactuando. Sin embargo, al añadir los copolímeros se inhibe las distintas etapas de la angiogénesis no produciéndose migración ni orientación de las células y no existiendo interacciones entre ellas.

VI.4 Bibliografía

- (1) Fernández-Tornero, C.; Lozano, R. M.; Redondo-Horcajo, M.; Gómez, A. M.; López, J. C.; Quesada, E.; Uriel, C.; Valverde, S.; Cuevas, P.; Romero, A., and Giménez-Gallego, G. Leads for development of new naphthalenesulfonate derivatives with enhanced antiangiogenic activity. Crystal structure of acidic fibroblast growth factor in complex with 5-amino-2-naphthalenesulfonate. *The Journal of biological chemistry*. **2003**, 278 (24), 21774-21781.
- (2) Schor, A. M.; Ellis, I., and Schor, S. L. Chemotaxis and Chemokinesis in 3D Macromolecular Matrices. 2001, 163-183
- (3) Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L., and Akhtar, N. Angiogenesis Assays: A Critical Overview. *Clin Chem*. **2003**, 49 (1), 32-40.
- (4) Madri, J.; Pratt, B., and Tucker, A. Phenotypic modulation of endothelial cells by transforming growth factor-beta depends upon the composition and organization of the extracellular matrix. *J. Cell Biol*. **1988**, 106 (4), 1375-1384.
- (5) Bishop, E. T.; Bell, G. T.; Bloor, S.; Broom, I. J.; Hendry, N. F. K., and Wheatley, D. N. An in vitro model of angiogenesis: Basic features. *Angiogenesis*. **1999**, 3 (4), 335-344.
- (6) Donovan, D.; Brown, N. J.; Bishop, E. T., and Lewis, C. E. Comparison of three in vitro human 'angiogenesis' assays with capillaries formed in vivo. *Angiogenesis*. **2001**, 4 (2), 113-121.
- (7) Lawley, T. J., and Kubota, Y. Induction of morphologic differentiation of endothelial cells in culture. *Journal of Investigative Dermatology*. **1989**, 93 (2 SUPPL.), 59S-61S.

- (8) Bornstein, P., and Sage, E. H. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Current Opinion in Cell Biology*. **2002**, 14 (5), 608-616.
- (9) Lutolf, M. P., and Hubbell, J. A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnology*. **2005**, 23 (1), 47-55.
- (10) Serban, M. A.; Liu, Y., and Prestwich, G. D. Effects of extracellular matrix analogues on primary human fibroblast behavior. *Acta Biomaterialia*. **2008**, 4 (1), 67-75.
- (11) Auerbach, R.; Auerbach, W., and Polakowski, I. Assays for angiogenesis: A review. *Pharmacology and Therapeutics*. **1991**, 51 (1), 1-11.
- (12) Auerbach, R.; Lewis, R.; Shinnars, B.; Kubai, L., and Akhtar, N. Angiogenesis assays: A critical overview. *Clinical Chemistry*. **2003**, 49 (1), 32-40.
- (13) Nehls, V., and Drenckhahn, D. A novel, microcarrier-based in vitro assay for rapid and reliable quantification of three-dimensional cell migration and angiogenesis. *Microvascular Research*. **1995**, 50 (3), 311-322.
- (14) Nagy, J. A.; Brown, L. F.; Senger, D. R.; Lanir, N.; Van De Water, L.; Dvorak, A. M., and Dvorak, H. F. Pathogenesis of tumor stroma generation: A critical role for leaky blood vessels and fibrin deposition. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. **1988**, 948 (3), 305-326.
- (15) Nagy, J. A.; Meyers, M. S.; Masse, E. M.; Herzberg, K. T., and Dvorak, H. F. Pathogenesis of ascites tumor growth: Fibrinogen influx and fibrin accumulation in tissues lining the peritoneal cavity. *Cancer Research*. **1995**, 55 (2), 369-375.
- (16) Anand-Apte, B.; Pepper, M. S.; Voest, E.; Montesano, R.; Olsen, B. R.; Murphy, G.; Apte, S. S., and Zetter, B. Inhibition of angiogenesis by tissue inhibitors of metalloproteinase-3. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. **1997**, 38 817-823.
- (17) Lafleur, M. A.; Handsley, M. M.; Knauper, V.; Murphy, G., and Edwards, D. R. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *J Cell Sci*. **2002**, 115 (17), 3427-3438.

- (18) Fritschy, J. M. Is my antibody-staining specific? How to deal with pitfalls of immunohistochemistry. *European Journal of Neuroscience*. **2008**, 28 (12), 2365-2370.
- (19) Arce, V. Endocrinología, Universidad, Servizo de Publicacións e Intercambio Científico Vigo, Santiago de Compostela. 2004
- (20) Ingraham, J. Introducción a la microbiología, 1 ed., Editorial Reverte, Barcelona. 1998
- (21) Jaffe, E. A.; Nachman, R. L.; Becker, C. G., and Minick, C. R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *Journal of Clinical Investigation*. **1973**, 52 (11), 2745-2756.
- (22) Lefleur, M. A.; Handsley, M. M.; Knäuper, V.; Murphy, G., and Edwards, D. R. Endothelial tubulogenesis within fibrin gels specifically requires the activity of membrane-type-matrix metalloproteinases (MT-MMPs). *Journal of Cell Science*. **2002**, 115 (17), 3427-3438.

VII. Estudio de inhibición de la angiogénesis en modelo animal

VII.1 Introducción

Los modelos *in vivo* de angiogénesis se basan en la potente capacidad mitogénica de distintos factores pro-angiogénicos (VEGF, FGF)¹. Estos factores de crecimiento provocan la división y propagación celular a partir de vasos sanguíneos existentes que van formando ramificaciones que alcanzan la madurez cuando se interconectan entre distintos vasos.

Uno de los métodos cuantitativos más utilizados para el estudio de la angiogénesis *in vivo* son los injertos de Matrigel® en ratones². Como se comentó en el capítulo anterior, el Matrigel® es una mezcla gelatinosa de proteínas, glicoproteínas y factores de crecimientos que se obtiene a partir de secreciones de tumores tipo Engelbreth-Holm-Swarm. Es líquido a 4 °C y forma un gel cuando se calienta a 37 °C³. En ensayos *in vitro* se ha demostrado que, al sembrar células HUVEC sobre el Matrigel®, éstas se diferencian porque forman estructuras similares a vasos sanguíneos⁴. Por otro lado, en ensayos *in vivo*, se utiliza inyectándose por vía subcutánea en la región ventral de ratones (Figura VII.1) formándose un tapón de Matrigel®. Si además le añadimos algún factor proangiogénico, como el bFGF, sucede que las células endoteliales migran desde el ratón al tapón de Matrigel® formando vasos sanguíneos plenamente funcionales y con circulación⁵.

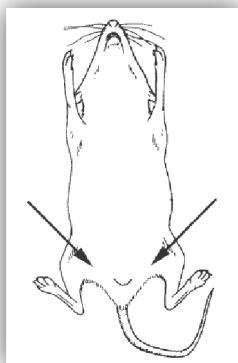


Figura VII.1. Diagrama de la zona ventral del ratón. Las flechas indican el sitio óptimo para el injerto con Matrigel®.

Este tipo de ensayos se pueden utilizar para analizar la capacidad angiogénica o antiangiogénica de cualquier compuesto soluble en medio fisiológico. Para ello, el Matrigel® se mezcla en frío con bFGF y el compuesto que deseamos estudiar antes de inyectarlo. Así pues, se comprueba la capacidad antiangiogénica mediante la inhibición de la formación de vasos sanguíneos dentro del Matrigel®².

Una consideración importante en este tipo de ensayos es el grado de variabilidad que se observa. Diferencias en los ratones y en la preparación del injerto puede afectar a los niveles de formación de vasos sanguíneos. Por otro lado, la edad y el género son también dos factores importantes a tener en cuenta, ya que la formación de vasos sanguíneos en ratones jóvenes (máximo 6 meses de edad) es reducida en comparación con ratones de 12 a 24 meses de edad⁶. Por último, el mejor sitio para realizar el injerto suele ser la zona de la ingle cercana a la línea media dorsal del ratón (Figura VII.1) que es la mejor área en res-

puesta a la angiogénesis en comparación con otras superficies como pueden ser el dorso del ratón. A pesar de estos problemas, éste es uno de los mejores ensayos *in vivo* para cuantificar el poder angiogénico o antiangiogénico de cualquier compuesto.

Para el estudio de la angiogénesis se ha utilizado la metodología desarrollada por el grupo de Neuroanatomía y Biología Celular del Instituto Cajal de La Rioja (CIBIR) para la determinación directa de la angiogénesis⁷⁻⁹. Este método está basado en la implantación de un tubo de silicona relleno de matrigel®, factores de crecimiento y el compuesto que queramos estudiar en ratones. Cuando se ha producido la formación de nuevos vasos sanguíneos se procede a su cuantificación mediante la inyección de una tinción que es transportada por el torrente sanguíneo y que únicamente actúa sobre los vasos sanguíneos plenamente funcionales. Esto nos da una medida directamente proporcional al volumen de vasos sanguíneos presentes en el implante de matrigel®.

VII.2 Materiales y métodos

Para la realización de los ensayos *in vivo* se han utilizado tubos de silicona de grado quirúrgico (0,15 cm de diámetro y 1 cm de longitud; New Age Industries, Southampton, PA) cerrados por un lado (Figura VII.2). El interior de cada tubo se rellena con una mezcla de Matrigel® y PBS (control negativo), PBS + 10 nM bFGF (control positivo) o PBS + 10 nM bFGF + polímero en estudio (0,1 mg/mL).

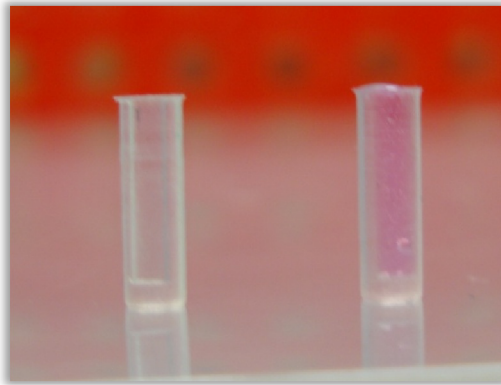


Figura VII.2.- Tubos de silicona utilizados en los ensayos *in vivo*. El tubo de la izquierda se encuentra vacío y el de la derecha relleno de Matrigel®.

Estos tubos se calientan a 37 °C para gelificar el Matrigel® y se injertan (2 tubos/ratón) bajo la piel en ratones hembras de seis semanas de edad (National Cancer Institut Nude Mouse Colony - Frederick Cancer Research and Development Center, Frederick, MD), cerrando el corte con grapas quirúrgicas (Figura VII. 3).

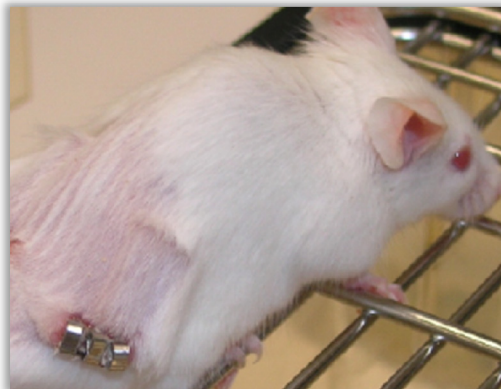


Figura VII. 3.- Injerto de tubos de Matrigel® en ratón.

Se han utilizado al menos tres ratones por muestra y su cuidado se realizó siguiendo las líneas institucionales y utilizando un proto-

colo previamente aprobado por éstas. Después de 11 días el ratón es inyectado intravenosamente con una disolución de isotiocianato de fluoresceína (FITC-Dextrano, 100 μ L/ratón; Sigma). Esta disolución se deja actuar durante 20 minutos y marca fluorescentemente los vasos sanguíneos por donde circula, poniendo claramente de manifiesto los vasos formados dentro del tubo de silicona debido al proceso de angiogénesis (Figura VII.4).

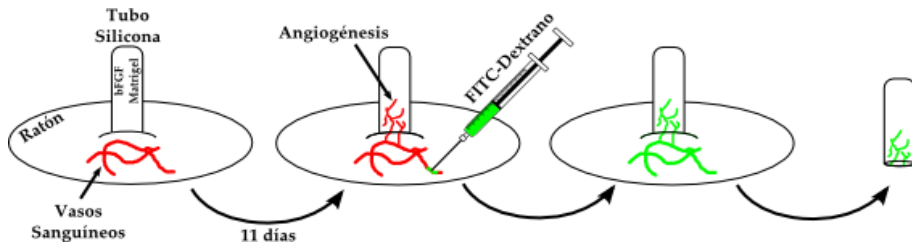


Figura VII.4. Ensayo *in vivo* de formación de vasos sanguíneos.

Para finalizar se extraen los tubos de silicona y se cuantifica el volumen de vasos sanguíneos formados midiendo la cantidad de fluorescencia dentro del implante usando un espectrofotómetro HP (Perkin Elmer).

VII.3 Resultados y discusión

Tal y como se observa en las imágenes (Figura VII.5), al final del periodo de incubación, los implantes control positivo (bFGF) contienen acumulaciones visibles de capilares sanguíneos (flechas en la Figura VII.5a)

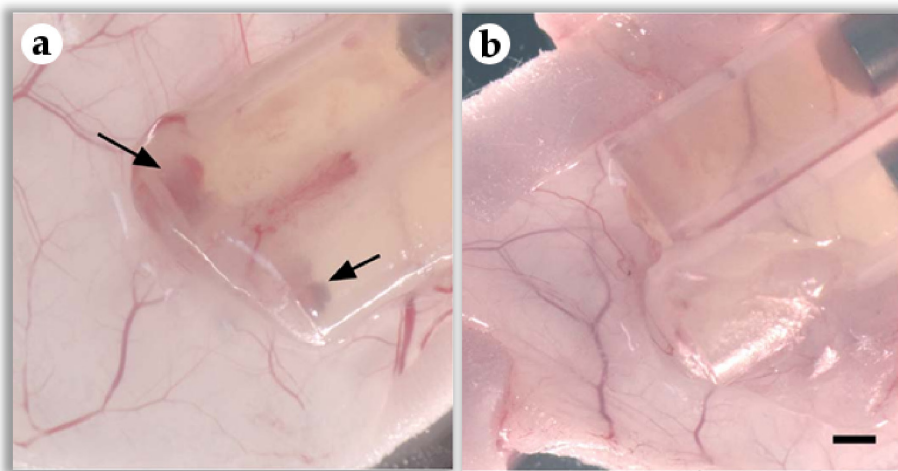


Figura VII.5. Ensayo de angiogénesis *in vivo*. (a) Control positivo. Las flechas muestran los capilares sanguíneos formados. (b) Control negativo.

Esta observación se confirmó posteriormente mediante la cuantificación de la cantidad de FITC-dextrano absorbida por los implantes como una medida indirecta del volumen de sangre que ha circulado a través de los nuevos capilares.

VII.3.1 Ensayos *in vivo* en los sistemas poli(AB-co-AMPS)

La Figura VII. 6 muestra los resultados de las medidas espectrofotométricas en los ensayos *in vivo* en el sistema poli(AB-co-AMPS) para los copolímeros (50:50) y (25:75).

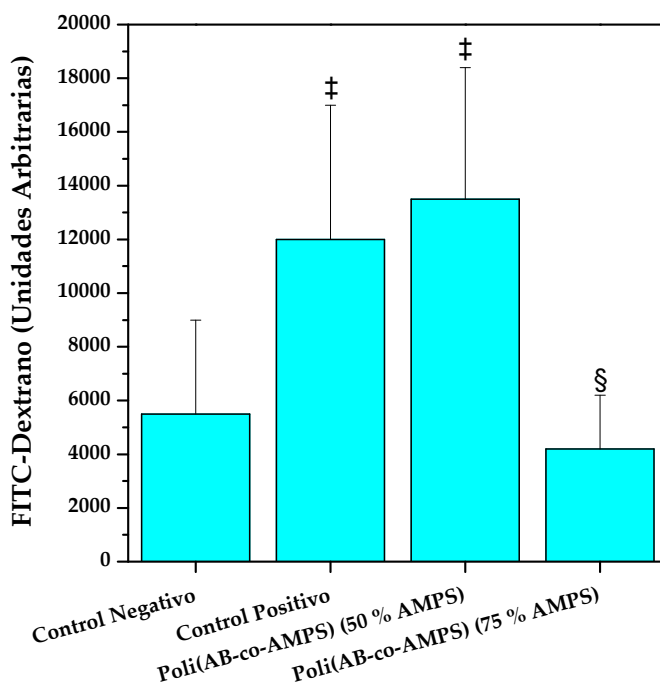


Figura VII. 6. - Inhibición de la angiogénesis *in vivo* por parte de los polímeros de AB y AMPS. Medidas espectrofotométricas del FITC-Dextrano absorbido por los vasos sanguíneos formados en los tubos de silicona. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre el control positivo con respecto al control negativo (‡) y de los copolímeros con respecto al control positivo (§).

El copolímero con un 50 % AMPS no muestra una inhibición significativa de la angiogénesis, mientras que los copolímeros con un 75% de AMPS muestran una inhibición significativa de la angiogénesis. Esta gran diferencia en el comportamiento de los copolímeros puede estar relacionada con la diferente conformación que adquieren en medio acuoso. Los copolímeros con el 50% de AMPS formaban nanoagregados, mientras que los copolímeros con el 75% de AMPS no los forma-

ban. Esto podría favorecer su interacción con los factores proangiogénicos presentes en el ensayo *in vivo* de forma distinta a lo que ocurría en los ensayos *in vitro*.

VII.3.2 Ensayos *in vivo* en los sistemas poli(VP-co-MANSA)

La Figura VII.7 muestra los resultados de las medidas espectrofotométricas en los ensayos *in vivo* en el sistema poli(VP-co-MANSA) para los copolímeros (50:50) y (70:30).

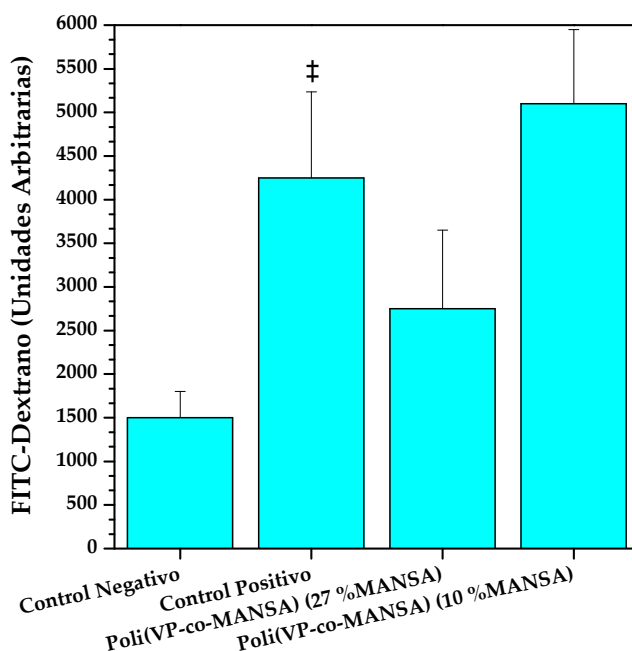


Figura VII.7. Inhibición de la angiogénesis *in vivo* por parte de los polímeros de VP y MANSA. Medidas espectrofotométricas del FITC-Dextrano absorbido por los vasos sanguíneos formados en los tubos de silicona. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre el control positivo con respecto al control negativo (‡) y de los copolímeros con respecto al control positivo (§).

Estos copolímeros no muestran una inhibición significativa de la angiogénesis. Esto se debe a que el ensayo se realiza con una concentración de copolímero de 0,1 mg/ml, por lo que estamos en el rango donde aún no empiezan a mostrar una clara actividad en los ensayos *in vitro* (Figura V.10), lo que se refleja en los ensayos *in vivo*. El copolímero con menor concentración de MANSA no muestra ningún efecto inhibitorio para concentraciones de 0,1 mg/ml, mientras que en el de mayor concentración de MANSA, aunque muestra una pequeña inhibición, no es estadísticamente significativa ($p=0,32$). Estos resultados coinciden prácticamente con los resultados obtenidos en los ensayos de inhibición de la mitogénesis inducida por aFGF.

VII.3.3 Ensayos *in vivo* en los sistemas poli(AB-co-MANSA)

Los sistemas con AB son los que han mostrado una mayor actividad en los ensayos *in vitro* debido a la formación de estructuras que permiten una mayor accesibilidad a los grupos sulfónicos del ANSA. Esta mayor actividad se vuelve a reflejar en los ensayos *in vivo*, como se observa en la Figura VII. 8.

En este caso ambas composiciones presentan una inhibición significativa de la angiogénesis *in vivo*, a pesar de la baja concentración utilizada (0,1 mg/ml), siendo ligeramente superior a mayor concentración de MANSA en el copolímero. Al igual que en el caso anterior estos resultados se corresponden con los obtenidos en la inhibición de la mitogénesis inducida por aFGF, mostrando una alta inhibición de la angiogénesis a bajas concentraciones.

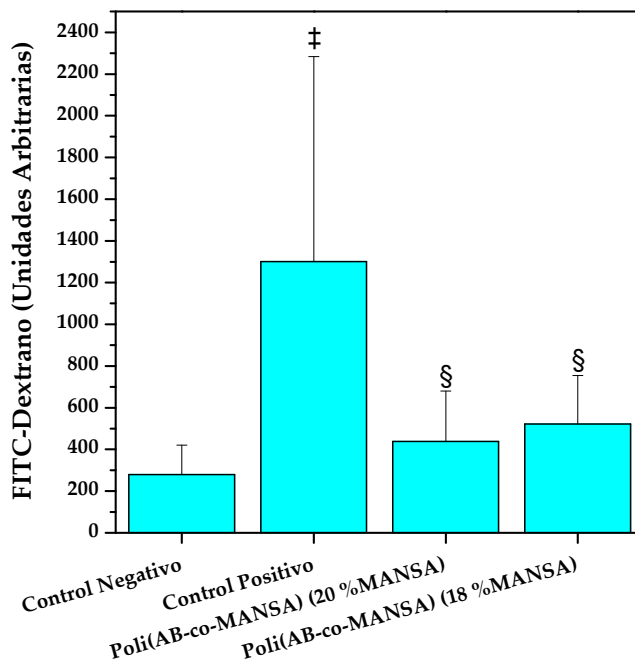


Figura VII. 8. - Inhibición de la angiogénesis *in vivo* por parte de los polímeros de AB y MANSA. Medidas espectrofotométricas del FITC-Dextrano absorbido por los vasos sanguíneos formados en los tubos de sílica. El diagrama incluye los resultados del test ANOVA para un nivel de significancia de $p < 0,05$ entre el control positivo con respecto al control negativo (‡) y de los copolímeros con respecto al control positivo (§).

Estos resultados posicionan al sistema poli(AB-co-MANSA) como un buen candidato para su uso como fármaco anti-angiogénico. Esta actividad se ve favorecida por la conformación que adquieren los copolímeros en medio acuoso, que hace más accesible los grupos sulfónicos para su interacción con los factores de crecimiento.

VII.4 Bibliografía

- (1) Góth, M. I.; Hubina, E.; Raptis, S.; Nagy, G. M., and Tóth, B. E. Physiological and pathological angiogenesis in the endocrine system. *Microscopy Research and Technique*. **2003**, 60 (1), 98-106.
- (2) Malinda, K. M. In Vivo Matrigel Migration and Angiogenesis Assays, In *Angiogenesis Protocols* Murray, J. C., Ed., Humana Press, New York. 2001, 47-52
- (3) Kleinman, H. K.; McGarvey, M. L.; Liotta, L. A.; Robey, P. G.; Tryggvason, K., and Martin, G. R. Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry*. **1982**, 21 (24), 6188-6193.
- (4) Auerbach, R.; Auerbach, W., and Polakowski, I. Assays for angiogenesis: A review. *Pharmacology and Therapeutics*. **1991**, 51 (1), 1-11.
- (5) Grant, D. S.; Kinsella, J. L.; Fridman, R.; Auerbach, R.; Piasecki, B. A.; Yamada, Y.; Zain, M., and Kleinman, H. K. Interaction of endothelial cells with a laminin A chain peptide (SIKVAV) in vitro and induction of angiogenic behavior in vivo. *Journal of Cellular Physiology*. **1992**, 153 (3), 614-625.
- (6) Passaniti, A.; Taylor, R. M.; Pili, R.; Guo, Y.; Long, P. V.; Haney, J. A.; Pauly, R. R.; Grant, D. S., and Martin, G. R. Methods in laboratory investigation: A simple, quantitative method for assessing angiogenesis and antiangiogenic agents using reconstituted basement membrane, heparin, and fibroblast growth factor. *Laboratory Investigation*. **1992**, 67 (4), 519-528.
- (7) Martínez, A. Expression of adrenomedullin and its receptor in normal and malignant human skin: A potential pluripotent role in the integument. *Endocrinology*. **1997**, 138 (12), 5597-5604.
- (8) Martínez, A. Proadrenomedullin NH2-terminal 20 peptide is a potent angiogenic factor, and its inhibition results in reduction of tumor growth. *Cancer research*. **2004**, 64 (18), 6489-6494.
- (9) Martínez, A. Molecular evolution of proadrenomedullin N-terminal 20 peptide (PAMP): Evidence for gene co-option. *Endocrinology*. **2006**, 147 (7), 3457-3461.

VIII. Summary and conclusions

The aim of this Thesis was the preparation and complete characterization of new antiangiogenic copolymers bearing sulfonic groups in their structure. The preparation of these systems has been made following a roadmap that includes the synthesis and characterization of a novel methacrylic monomer derived from 5-amino-2-naphthalene sulfonic acid. This monomer and 2-acrylamide-2-methylpropanesulfonic acid have been copolymerized with butyl acrylate and *N*-vinylpyrrolidone in order to obtain four families of copolymers with different mechanisms of action against growth factors and different behavior in aqueous media.

The microstructural characterization and supramolecular organization were characterized calculating the reactivity ratios (microstructure) and by zeta potential and light scattering measurements (supramolecular organization). These results showed that the copolymers had VP or AB rich sequences, except poly(VP-*co*-AMPS). This system presented a moderate alternating structure typical of azeotropic systems. The microstructure of the copolymers and the different hydrophilic/hydrophobic comonomers used gave rise to different organizations in aqueous media: those copolymers that incorporated the most hydrophobic monomer in their structure (AB) formed micelles where sulfonic groups were on the outside forming a hydrophilic corona.

The biological activity of these copolymers was tested using 2D and 3D *in vitro* assays. Firstly, the inhibition of aFGF-induced mitogenesis on fibroblasts was evaluated. aFGF is one of the most important pro-

angiogenic factors in the development of solid tumors. In this study have been demonstrated the influence of microstructure and supramolecular organization on the biological activity of the copolymers. The copolymerization of AMPS with VP generated copolymers with a tendency to form alternating sequences that did not present antimitogenic activity. However, poly(AB-*co*-AMPS) systems form AMPS-rich sequences in the polymer chain. These AMPS-rich sequences interacted with aFGF and inhibited the proliferation of the fibroblasts. In the case of the copolymers based on MANSA, the formation of micelles in the poly(AB-*co*-MANSA) systems makes the sulfonic groups more accessible, being more active than the copolymers based on VP.

In the angiogenesis process there are involved numerous cellular processes such as migration, proliferation and cell differentiation. In this sense, a three-dimensional assay for the study of angiogenesis *in vitro* was developed. Capillary-like structures were formed by endothelial cells when cultured in fibrin matrices and the appropriate growth factors were added to the media. The activity of the synthesized copolymers was evaluated using this assay. Poly(AB-*co*-AMPS), poly(AB-*co*-MANSA) and poly(VP-*co*-MANSA) prevented the formation of capillary-like structures and inhibited the proliferation, the migration and the differentiation of endothelial cells.

Finally, *in vivo* tests were performed in nude mice. In these tests silicones tubes filled with Matrigel® and the polymers under study were implanted in the mice in order to measure the formation of new

blood vessels. All polymers tested showed inhibition of angiogenesis *in vivo* being observed again an influence of the supramolecular organization of copolymers.

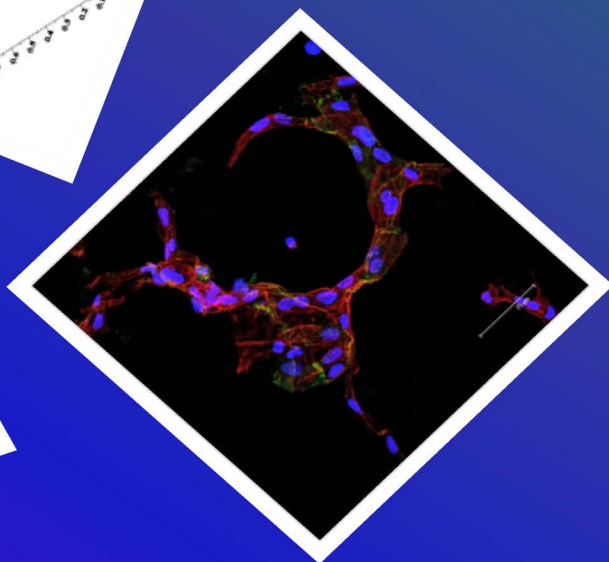
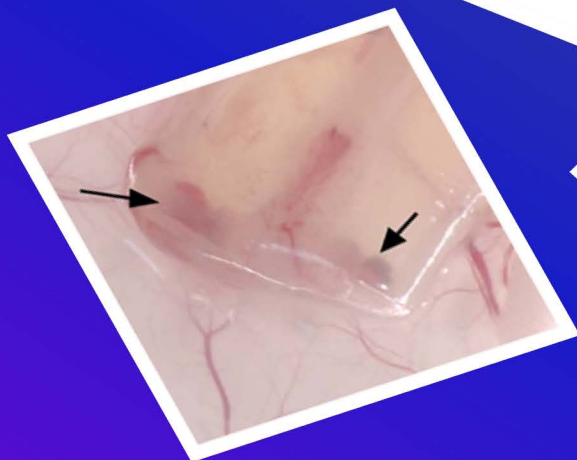
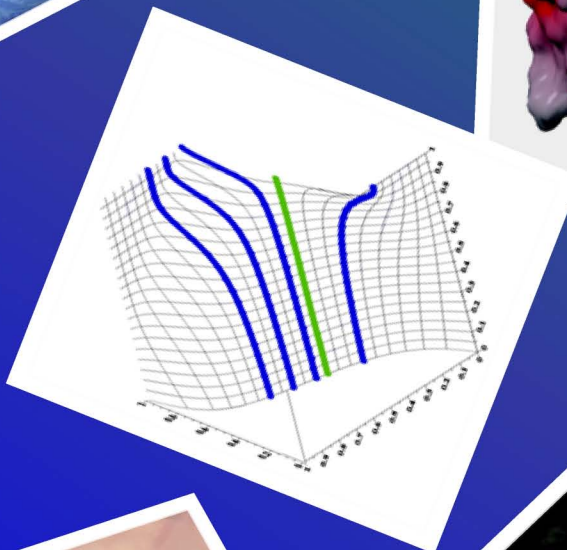
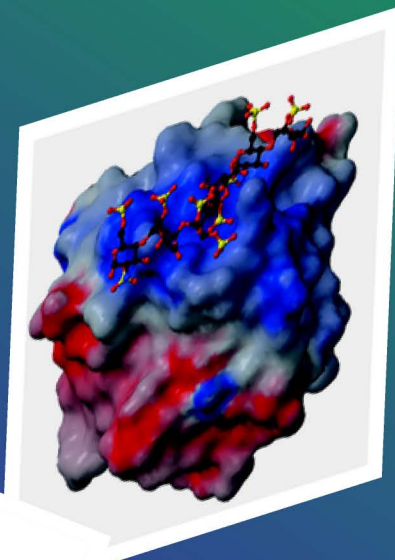
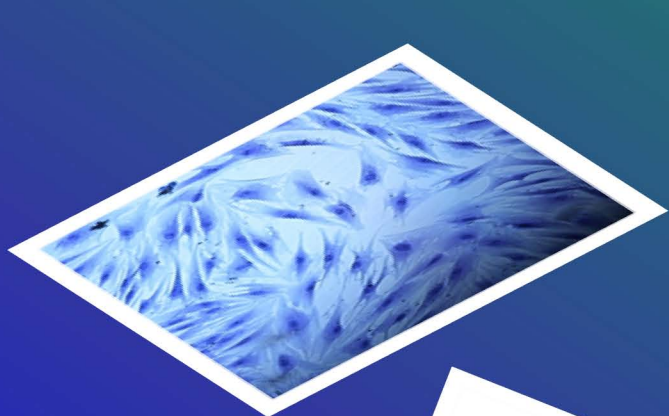
Therefore, the main conclusions of this work were:

1. Suramin and suradist inspired molecules, as ANSA, and polymers carrying sulfonic groups, as PAMPS, are good candidates as angiogenic inhibitors.
2. The copolymerization of these monomers bearing sulfonic groups in their structure with different hydrophobic/hydrophilic monomers and the different microstructure of the synthesized copolymers gave rise to a supramolecular organization of the copolymers.
3. The microstructure of the AMPS-based copolymers had a great influence on the biological activity. The interaction between the AMPS and aFGF required the presence of several adjacent AMPS units. This allowed the formation of a helical structure allowing the interaction with the aFGF. Poly(VP-*co*-AMPS) presented a rather alternating distribution of monomers along the copolymeric chains, whereas poly(AB-*co*-AMPS) presented a clear tendency for the formation of long block sequences that favor the interaction with FGF and therefore the antiproliferative activity of these polymers. Proliferation of the cultured cells could be modulated not only by varying the copolymer concen-

tration in the medium, but also by varying the copolymer composition and monomer sequence distribution.

4. ANSA interaction with aFGF is given in a 1:1 ratio. Poly(AB-co-MANSA) amphiphilic copolymers formed micelles by self-assembling in aqueous media. The hydrophobic AB sequences were concentrated in the core of the nanoparticles and the hydrophilic MANSA units were located on the surface or shell of the nanoparticles. These supramolecular structures could be used for the preparation of targeting bioactive nanoparticles by the encapsulation of hydrophobic molecules used as chemotherapeutic agents (taxotere, simvastatin, doxorubicin, etc.) that will be released in a controlled and modulated way in the site of action.
5. A new 3D *in vitro* assay for angiogenic studies was developed and the activity of the new copolymers was tested. The obtained information agreed with the 2D *in vitro* results and the *in vivo* results. Therefore this assay presented the advantages of an *in vitro* assay where quantification of different metabolic processes is allowed, and the advantages of an *in vivo* assay where endothelial cells do not form monolayers but organize themselves in branched capillary-like structures.

6. MANSA-based copolymers showed the highest inhibition of angiogenesis on the *in vivo* assay. AB-based copolymers presented the highest inhibitory effect. Therefore the poly(AB-co-MANSA) system may be a good candidate as angiogenesis inhibitor drug.



Las ciencias aplicadas no existen, sólo las aplicaciones de la ciencia.

Louis Pasteur